

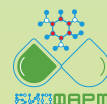


СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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

В РАМКАХ ПЛОЩАДКИ ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО, 2023



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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2023

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

М431 X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов — 2023: Сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2023. — 814 с.

ISBN 978-5-4437-1526-1

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной научно-практической конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2023.

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

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

РАЗДЕЛ I

БИОИНФОРМАТИКА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-1

**DEVELOPMENT OF A COMPUTATIONAL PIPELINE TO SEARCH AND ANALYZE GENES
OF MULTIDOMAIN PROTEIN FAMILIES***

M. E. Bocharnikova¹, D. A. Afonnikov^{1,2}

¹*Kurchatov Genome Center, Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

²*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

✉ lachynova@bionet.nsc.ru

Abstract

We propose the OrthoDom computational pipeline, which is aimed at searching for orthologous proteins taking into account their domain composition. We tested the systems accuracy and implemented it for phospholipase A2 analysis in flatworms.

Modern sequencing technologies have led to a huge flow of data on plant genome sequences. This data requires a high-performance computer annotation to determine protein functions. In this paper, we propose the OrthoDom computational pipeline, which is aimed at searching for orthologous proteins taking into account their domain composition. The pipeline is implemented based on the Snakemake system.

The aim of the work is to create an automatic computing conveyor for the search and analysis of orthologists in the genomes of groups of organisms.

Tasks:

- 1) analysis of the literature and the choice of means to solve the problem;
- 2) creating a computing conveyor using the Snakemake platform;
- 3) evaluation of the accuracy of identification of orthologists for the created conveyor;
- 4) the use of the conveyor for the analysis of the proteins of the family of phospholipase A2 in flatworms.

The conveyor was tested on 12 insects and 12 protein sequences. As a result, as described above, the difference in metrics was 3–4 percent. Also, the conveyor was launched from 3, 6, 9, 12 proteins and 3, 6, 9, 12 genomes. When varying proteins, the working hours are almost constantly, and with an increase in the number of genomes the operating time of the conveyor increases linearly.

*The work was funded by Kurchatov Genome Center of ICG SB RAS (project № 075-15-2019-1662).
© M. E. Bocharnikova, D. A. Afonnikov, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-2

SEARCH FOR POTENTIAL MASTER REGULATOR MOLECULES RESPONSIBLE FOR EARLY STAGES DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS*

D.D. Borodko¹, V.N. Sukhorukov², N.N. Nikiforov¹, A. V. Omelchenko¹

¹*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow*

²*Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow*

✉ daria.borodko@gmail.com

Abstract

Despite active research on atherosclerosis, which is nowadays a major cause of cardiovascular morbidity and mortality, the mechanisms underlying its development in the early stages have not been identified yet. We conducted a transcriptomic analysis of samples from cybrid cultures exposed to LPS and discovered 9 potential master regulators, that are associated with mitochondrial stress and chronic inflammation, which are known to precede plaque formation.

Motivation and Aim

Atherosclerosis, a complex and multifactorial disease, is a major cause of cardiovascular morbidity and mortality worldwide. It is characterized by the gradual accumulation of lipids, inflammatory cells, and extracellular matrix within the arterial wall, leading to the formation of atherosclerotic plaques. Despite extensive research on the molecular and cellular mechanisms involved in atherosclerosis progression, the identification of master regulator (MR) molecules responsible for the early stages of the disease remains elusive. The aim of this study is to unravel the potential MR molecules that play a pivotal role in initiating and driving the early stages of atherosclerosis development. By elucidating these critical regulatory factors, we anticipate gaining valuable insights into the underlying molecular pathways and key cellular processes that trigger atherogenesis, which will potentially lead to the identification of novel therapeutic targets for early intervention and improved patient outcomes.

Methods and Algorithms

We sequenced 43 RNA samples with Illumina NovaSeq 6000. The samples were extracted from 9 cybrid cultures exposed to LPS (0 to 2 round of stimulations). We mapped reads to human GRCh38 assembly with STAR and then the quality was assessed with RSeQC. Count matrix was obtained within the STAR protocol and then we used DESeq2 v1.38.0 to perform differential expression analysis. Metabolic pathways were discovered for significant DEGs with DAVID tool. For master regulators (MR) search we used GeneWays database and network-based search algorithm implemented in geneXplain platform and then filtered obtained lists of MRs with the R script.

Results

We conducted an experiment involving 8 lines of monocyte cybrids and a control line THP-1 aimed to measure the level of cytokines IL1B, TNF α , IL6, IL8, and CCL2 secretion before and after LPS stimulation. We performed two rounds of stimulations and conducted RNA sequencing for samples before and after each treatment. We categorized the sequenced cybrid samples into three groups based on their immune response for each cytokine and used DESeq2 to perform differential expression analysis for each group. Our findings showed that the expression of IL1B increases after the first stimulation, while it significantly reduces after the second stimulation in cultures tolerant to LPS. The expression of other cytokines significantly increases only in the first stimulation, in all groups. We compiled a list of pro-inflammatory cytokines and found that the sets of upregulated cytokines differ significantly between the groups, in both stimulations. So, we performed the search for master regulator molecules to discover possible common regulation mechanisms. Applying network-based approach on sets of DEGs allowed us to discover 6 MRs possibly responsible for the upregulation of proinflammatory cytokines in non-tolerant to LPS cybrids. IL16, which is known to be promoting inflammatory response in obese and atherosclerotic patients, and proinflammatory cytokine IL3 are on the upregulating list, accompanied by *OSM*, *ZBTB32* and *LBR*. Also, we found 3 MRs that can downregulate those cytokines in tolerant cybrid lines after 1st stimulation, including *MMP2* that is involved in atherosclerotic plaque rupture and initiates a primary innate immune response by inducing mitochondrial-nuclear stress.

Conclusion

The set of obtained MR molecules sheds light on potential mechanisms of the atherosclerosis development on early stages, which include common signaling pathways with obesity phenotype formation and innate inflammatory response, and shows the possible connection between lack of immune response and inhibition of mitochondrial stress pathways.

*The study was supported by RSF grant № 23-65-10014.

© D. D. Borodko, V. N. Sukhorukov, N. N. Nikiforov, A. V. Omelchenko, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-3

MITOCHONDRIAL DNA AH > GH MUTATION AND ITS ASSOCIATIONS WITH BIRDS LIFE-HISTORY TRAITS *

Y. S. Gusarov¹, A. G. Mikhailova¹, D. V. Iliushchenko¹, B. E. Efimenko¹, K. V. Gunbin¹, V. O. Burskaya², K. Y. Popadin^{1,3}

¹Center for Mitochondrial Functional Genomics, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

²University of Antwerp, Belgium

³Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland

✉ yurguss@mail.ru

Abstract

Mitochondria is a double-membrane organelle, which is always under pressure of reactive oxygen species. Those molecules are the main reason for Ah > Gh (h — heavy strand) mutation both in fishes [1] and mammals [2]. Here we analyze birds mitochondrial DNA (mtDNA) mutational spectrum and its connections to their life-history traits.

One of the main processes, occurring in mitochondria, is oxidative phosphorylation. One of its byproducts is reactive oxygen species (ROS). One of the main targets of their dangerous influence is mtDNA. Nevertheless, we still don't know much about their mutational signature. Recently it was shown that those molecules are the main reasons for Ah > Gh substitution in different classes of vertebrates. In mammals, these substitutions were connected to longevity [2]. In fish — with water temperature [1]. Yet nothing was discovered about the mitochondrial mutational spectrum of birds. So, we decided to analyze it. We created a large dataset for 766 bird species, containing their mtDNA and life-history traits information, using two separate databases [3, 4]. We analyzed birds mtDNA four-fold neutral positions. We observed an increase of Gh in their mtDNA. Also, its amount was increasing with gene-specific time being single stranded. Next, we compared birds and mammals mtDNA. We saw that birds mtDNA is 1,5–4 times richer with Gh compared to mammals.

After these results we started to search for reasons of such guanine enrichment. We studied correlations between different birds life-history traits and mtDNA guanine content. We saw no connections between our guanine metrics and birds mass, which is connected to basal metabolic rate. So, we made a conclusion that birds mutational spectrum has no connections to the level of metabolism. After that we analyzed mtDNA Gh-content across birds with different abilities to fly. We saw that birds, which have lost the ability to fly a long time ago, have lower Gh-content compared to flying species. Only one group of birds didn't follow this trend — penguins. We started to analyze the reasons behind it. We discovered that diving birds (containing penguins) have increased guanine metrics compared to non-divers. We made a conclusion that this factor is the main reason for birds mtDNA Ah > Gh mutations.

References

1. Mikhailova A. G., Iliushchenko D., Shamansky V. et al. A mitochondrial mutational signature of temperature in ectothermic and endothermic vertebrates. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.07.25.221184>.
2. Mikhailova A. G., Mikhailova A. A., Ushakova K. et al. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50 (18). P. 10264–10277. DOI: 10.1093/nar/gkac779.
3. O'Leary N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation // *Nucleic acids research.* 2016. Vol. 44, № D1. P. D733–D745.
4. Tobias J. A., Sheard C., Pigot A. L. et al. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds // *Ecology Letters.* 2022. Vol. 25. P. 581–597.

* The study was supported by RSF grant № 21-75-20143.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-4

DEEP MUTATIONAL SPECTRUM OF MITOCHONDRIAL GENOME IN VERTEBRATES AS A NEW TYPE OF SPECIES – SPECIFIC MOLECULAR PHENOTYPE*

D. V. Iliushchenko, B. E. Efimenko, K. V. Gunbin, K. Y. Popadin

High School of Life Sciences IKBFU, Kaliningrad

✉ iliushchenkodmitrii@gmail.com

Abstract

The deep mutational spectrum (MS), an informative representation of de novo mutations with contextual data, offers valuable biological insights into the primary sources of mutations across diverse genes, cancers, and species. However, reconstructing a comprehensive mutational spectrum demands substantial data, which is often lacking for non-model species. To address this challenge, we present a novel approach integrating sparse species-specific mitochondrial DNA (mtDNA) mutational spectra based on 122,031 polymorphic reconstructed synonymous mutations within the CytB gene of 974 vertebrate species. Leveraging this dataset, we reconstructed a 192-component mutational spectrum encompassing all vertebrates.

The mitochondrial mutational spectrum, encompassing the types and frequencies of nucleotide substitutions at neutral positions, has the potential to unveil crucial insights into the mutagens affecting different species. Recent investigations have revealed fascinating mitochondrial signatures within distinct classes of vertebrate animals. Notably, the mutational spectrum has been found to correlate with the level of aerobic metabolism, approximated through generation length in mammals and ambient temperature in fishes [1, 2].

In this study, we have extended our previous approach of a simple 12-component mutational spectrum (comprising 4 nucleotides and 3 types of substitutions) by considering nucleotide context. As a result, we obtained a comprehensive 192-component mutation spectrum ($4 \times 12 \times 4$) for each species. Furthermore, we developed a powerful tool to combine and compare the normalized mutational spectra of different species. By inferring an integrated 192-component MS for all vertebrates and five vertebrate classes separately, we gain insights into the evolutionary dynamics of mitochondrial mutations and their comparability to the mitochondrial MS of human cancers. Our methodology addresses various methodological challenges, including CytB gene site-to-site evolutionary variation, data inequality from different species, and comparability of taxa-specific MSs.

Our findings reveal that the majority of reconstructed MSs can be attributed to oxidative damage, shedding light on the underlying mutational processes. Notably, the MSs of birds and human cancers exhibit the most significant divergence from the MSs of all vertebrate groups, supporting the hypothesis that bird-specific MSs are influenced by normoxia, while cancer-specific MSs are shaped by hypoxia. Furthermore, we identify a dominant peak in the MSs of five vertebrate classes — $cCc > cTc$ — which has been experimentally confirmed to result from oxidative damage to single-stranded DNA. Additionally, we observe another prominent peak, $nAt > nGt$, which is associated with adenosine methylation, a nucleotide modification sensitive to normoxia/hypoxia regimes.

Our integrative approach provides valuable insights into the impact of mutagens on vertebrate mitochondrial mutational spectra and highlights the relevance of oxidative damage in shaping these patterns. These findings contribute to a better understanding of mutational processes in vertebrates and offer potential implications for the study of diseases associated with mitochondrial dysfunction.

References

1. Mikhailova A. G. et al. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // *Nucleic Acids Res. Oxford Academic*. 2022. Vol. 50, № 18. P. 10264–10277.
2. Mikhailova A. G. et al. A > G substitutions on a heavy chain of mitochondrial genome marks an increased level of aerobic metabolism in warm versus cold vertebrates // *bioRxiv*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.07.25.221184>.

* The study was supported by RSF grant № 21-75-20143.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-5

METHODOLOGICAL APPROACH FOR *IN SILICO* GENOTYPING – VALIDATION ON SEQUENCING RESULTS FOR *CANIS LUPUS FAMILIARIS**

V. N. Kipen, E. V. Snytkov

Institute of Genetics and Cytology NAS, Minsk, Belarus

✉ v.kipen@igc.by, evsnytkov@gmail.com

Abstract

We have developed the GENIS software (**GEN**otyping **I**n **S**ilico) to automate the *in silico* genotyping process for SRA files of whole genome sequencing (NGS) projects.

The challenge of distinguishing closely related biological species through the analysis of molecular markers, primarily using single nucleotide substitutions (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), is currently important: control of hybridization, breeding of novel breeds and varieties, genetic migration processes, and forensic bias — fight against poaching and counterfeiting.

There is no universal approach that would allow solving this problem using open NGS data. There exists a considerable number of free or shareware applications, such as UGENE (ugene.net) or GATK (gatk.broadinstitute.org), which contain NGS data analysis algorithms that encompass genotype determination in SNP, local alignment, and determination of reading depth in the analyzed nucleotide position.

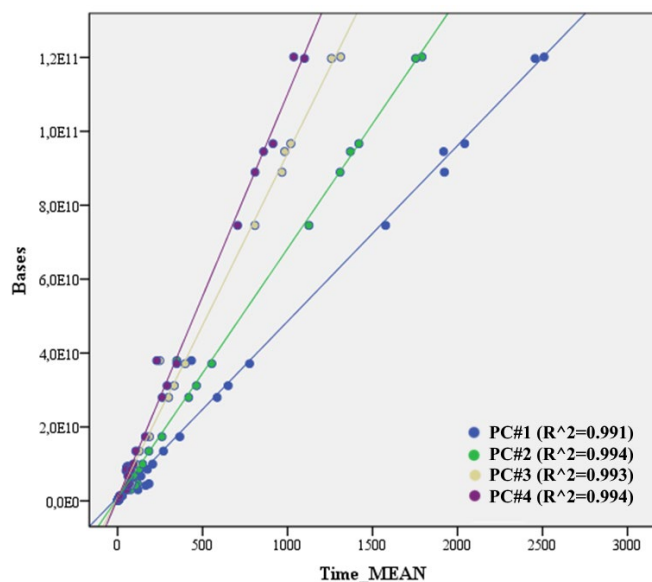
Nevertheless, the software products available to us cannot be used due to a number of restrictions: either it is necessary to upload large amounts of data to cloud storage, the rental of which is paid; or the pipeline coded in the software is not capable. In order to automate the process of searching for nucleotide sequences flanking the desired allele, we have developed the GENIS (**GEN**otyping **I**n **S**ilico) software, written in the Python v.3.10 [1] software engineering language, in the Jupyter Notebook [2] software development environment. The GENIS software operates using an approach that involves registering the occurrence of the desired sequence in the sequence in the file with sequencing results (in.fastq format). If an entry is registered, the software takes into account the allele (A/T/G/C), as well as the total number of such entries in the file with sequencing results and the read quality in the analyzed single nucleotide substitution.

Subsequently, all the information received is compiled and, depending on the information received (allele/coverage), a decision is made to assign a particular genotype to a particular SNP. Due to the fact that, as a rule, it is necessary to test hundreds of files with NGS results for thousands of SNPs to search for species- or breed-specific SNPs, we also considered the possibility of parallel analysis of one file for different SNPs.

For example, we developed a methodological approach for genotyping using a PC with the following characteristics: CPU — Intel Core i7-13700K (frequency 5600 MHz, timings — 40-40-40-80); RAM — DDR5 (16 GB); motherboard — AsRock Z690 Steel Legend/D5; SSD — Patriot Viper VPN100 1TB VPN100-1TB-M28H — allows you to determine 10000 genotypes *in silico*, i.e. 100 SNPs for 100 *Canis lupus familiaris* samples with an average coverage in the desired nucleotide $\approx 10\text{--}20\times$, in 70–100 h.

References

1. Python 3.10.0. URL: <https://www.python.org/downloads/release/python-3100/>.
2. Jupyter Notebook. URL: <https://jupyter.org/>.



Comparative aspect: the relationship between the time to determine the genotype (sec) *in silico* [X-axis] and the total number of nucleotides in the working file [Y-axis] for four PCs

* The study was supported by BRFFR grant № B23-060 (2023–2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-6

BIONFORMATIC ANALYSIS OF THE GENOMES OF WILD AND DOMESTIC ANIMALS OF THE SPECIES *SUS SCROFA* TO UPGRADE THE “SWINE/WILD BOAR” DIFFERENTIATION MODEL*

V. N. Kipen, E. V. Snytkov

Institute of Genetics and Cytology NAS, Minsk, Belarus

✉ v.kipen@igc.by, evsnytkov@gmail.com

Abstract

Using bioinformatic methods, the analysis of projects on genome-wide sequencing (NGS) of animals of the species *Sus scrofa scrofa* (wild boar) and *Sus scrofa domesticus* (domestic pig) was carried out, as a result of which polymorphisms (SNPs) with significant differentiating potential were determined.

The problem of differentiation of wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic pig (*Sus scrofa domesticus*) can be solved using the analysis of three polymorphic variants (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) in the genes *MC1R*, *NR6A1* and *HEPH* [1]. Earlier in the *HEPH* gene, based on the bioinformatic analysis of SRA for individuals of the species *Sus scrofa*, we identified an additional polymorphic variant with a presumably high differentiating potential — H3GA0051811 (*HEPH*).

It is known that the *HEPH* gene (hephaestion, NCBI Gene ID: 100512938) is located on X-chromosome (NC_010461.5 (52314911..52397384), Sscrofa11.1 (GCF_000003025.6)). In order to neutralize this fact a large-scale bioinformatic analysis of more than 250 genomes of *Sus scrofa* individuals was carried out: PRJNA671763, PRJNA626370, PRJNA622908, PRJNA553106, PRJNA550237, PRJNA485589, PRJNA41185, PRJNA393920, PRJNA378496, PRJNA309108, PRJNA260763, PRJNA255085, PRJNA507853, PRJNA506339, PRJNA488960, PRJNA487172, PRJNA520978, PRJNA176478, PRJEB9922, PRJEB1683, PRJNA369600, PRJNA358108 PRJNA343658, PRJNA322309 and PRJNA239399.

The total number of SNPs in the analysis at the first stage is 7451 [2]. Sequenced nucleotide sequences of *Sus scrofa domesticus* individuals, which were analyzed at this stage, were presented in the format *.fasta and had the status “aligned” for each chromosome. At the second stage, an abbreviated list of SNPs was formed, for which statistically significant associations were identified using ROC analysis ($p < 0.001$). Sequenced nucleotide sequences of *Sus scrofa domesticus* individuals, which were analyzed at this stage, were presented in SRA format, which were additionally converted to *.fasta format using the SRA-Toolkit v.2.11 package. To automate the process of searching for nucleotide sequences *in silico* flanking the desired allele, a script in the Python v.3.10 programming language was used, using the Jupyter Notebook software development environment (own software GENIS). The differentiating potential for SNP was carried out using ROC analysis in SPSS v.20.0.

As a result of extended bioinformatics analysis more than 15 SNPs were identified with an estimated AUC value of more than 0.85, some of which are presented in the table.

SNP for domestic pig and wild boar differentiation

Probe Set ID*	AUC**	p-level	95 % CI	
			Lower limit	Upper limit
AX-116263131	0.820	3.525E-10	0.722	0.917
AX-116263145	0.923	6.972E-16	0.864	0.982
AX-116263146	0.866	2.542E-13	0.782	0.951
AX-116263147	0.951	4.218E-17	0.923	0.979
AX-116263162	0.913	1.875E-17	0.850	0.977
AX-116347222	0.847	6.664E-11	0.746	0.948
AX-116378815	0.891	8.918E-20	0.841	0.941

*Axiom_PigHD_v1.na35.r4.a2.annot.csv.zip

** state variable value — 1 (wild boar)

In the future, it is necessary to test the differentiating potential of the identified SNPs on the formed swine/wild boar samples for samples from Belarus.

References

1. Kipen V. N., Ivanova E. V., Snytkov E. V., Verchuk A. N. Analysis of HEPH gene polymorphism on the X chromosome for identification of wild boar and domestic pig // Russian Journal of Genetics. 2020. Vol. 56 (9). P. 1099–1108. DOI: 10.1134/S1022795420080062.
2. Kipen V. N., Snytkov E. V., Mihajlova M. E., Shejko R. I. Differenciaciya porod domashnih svinej c ispol'zovaniem rasshirennogo bioinformaticeskogo analiza SNP // Doklady Nacional'noj akademii nauk Belarusi. 2022. Vol. 66, № 3. P. 301–309. DOI: 10.29235/1561-8323-2022-66-3-301-309.

*The study was supported by BRFFR grant № B23-060 (2023–2025).

© V. N. Kipen, E. V. Snytkov, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-7

**BIONFORMATIC ANALYSIS OF THE GENOMES OF WILD AND DOMESTIC ANIMALS
OF THE SPECIES *CANIS LUPUS* TO UPGRADE THE “WOLF/DOG” DIFFERENTIATION MODEL***

V. N. Kipen, E. V. Snytkov

Institute of Genetics and Cytology NAS, Minsk, Belarus

✉ v.kipen@igc.by, evsnytkov@gmail.com

Abstract

Using bioinformatic methods, the genomes (SRA) of the animal species *Canis lupus* and *Canis lupus familiaris* were analyzed, as a result of which polymorphisms (SNPs) with significant differentiating potential were identified.

It is an urgent task to differentiate biological samples belonging to individuals of the biological species *Canis lupus* and *Canis lupus familiaris* using single nucleotide polymorphisms (SNP).

Our previous analysis utilizing bioinformatics methods enabled us to identify several SNPs that were significant for the differentiation of wolf/dog samples, including g.27748425T>C (*ADCY8* gene) and g.1414373T>C (*RYR3* gene). The differentiating potential for SNPs was assessed as exceedingly high, with g.27748425T>C (*ADCY8*) — AUC = 0.949 (95 % CI 0.933–0.965, p = 2.77E-21); for SNP g.1414373T>C (*RYR3*) — AUC = 0.874 (95 % CI 0.817–0.931, p = 3.20E-15) [1].

Further, when combining the results of bioinformatics and molecular genetic analysis for these SNPs for 1095 animals (283 *Canis lupus*, 812 *Canis lupus familiaris*), the differentiating potential for these SNPs was updated: g.27748425T>C (*ADCY8* gene) — AUC = 0.947 (95 % CI 0.934–0.960, p = 3.45E-112), g.1414373T>C (*RYR3* gene) — AUC = 0.893 (95 % CI 0.871–0.915, p = 4.31E-87) [2]. According to the results obtained, the balanced accuracy of the two-SNP model was 96.2 % (model specificity 96.3 %, sensitivity 98.9 %).

In our opinion, individuals of a wolf or a dog deserve special attention, which may belong to wolfdogs (hybrids between a wolf and a dog). In this regard, in order to improve the previously proposed [2] “WOLF/DOG” differentiation model, further search for SNPs with a high differentiating potential is required, which was the goal of this study.

SNP for wolf and dog differentiation

SNP	Probe Set ID*	AUC**	p-level	95 % CI	
				Lower limit	Upper limit
SNP_006	AX-167407452	0.937	1.18E-28	0.903	0.971
SNP_047	AX-168242400	0.075	3.65E-27	0.037	0.113
SNP_074	AX-168056778	0.982	1.84E-34	0.963	1.000
SNP_091	AX-168128912	0.973	3.39E-33	0.950	0.995
SNP_118	AX-167949406	0.988	3.05E-35	0.973	1.000
SNP_259	AX-168147543	0.028	4.23E-33	0.005	0.051
SNP_265	AX-167788863	0.975	1.85E-33	0.953	0.996
SNP_298	AX-168251452	0.038	7.99E-32	0.010	0.065
SNP_361	AX-168191809	0.126	2.25E-21	0.076	0.176
SNP_385	AX-168048197	0.908	3.77E-25	0.866	0.950
SNP_400	AX-167189856	0.932	5.52E-28	0.895	0.969
SNP_449	AX-167716006	0.969	1.08E-32	0.945	0.993
SNP_488	AX-167829464	0.038	7.59E-32	0.011	0.064
SNP_491	AX-167224318	0.918	2.35E-26	0.878	0.959
SNP_523	AX-167341569	0.943	2.13E-29	0.909	0.977
SNP_539	AX-167275821	0.935	2.29E-28	0.900	0.970
SNP_555	AX-167221725	0.949	3.91E-30	0.918	0.980
SNP_580	AX-168227942	0.952	1.61E-30	0.921	0.983
SNP_582	AX-167627072	0.966	2.68E-32	0.940	0.992

*TFS-Assets_LSG_Support-Files_Axiom_K9_HD.na35.r5.a7.annot.csv.zip
**state variable value — 1 (WOLF)

As a result of extended bioinformatics analysis (projects PRJEB20635, PRJEB34110, PRJEB39198, PRJEB42199, PRJEB43408, PRJEB44869, PRJNA192935, PRJNA208087, PRJNA232497, PRJNA255370, PRJNA26

*The study was supported by BRFFR grant № B23-060 (2023–2025).

3947 PRJNA274504 PRJNA319610 PRJNA358192 PRJNA389294 PRJNA389682 PRJNA448733 PRJNA494719 and PRJNA648123) on Chr.1 (NC_006583.3; CanFam3.1 (GCF_000002285.3)), Chr.13 (NC_006595.3; CanFam3.1 (GCF_000002285.3)) and Chr.30 (NC_006612.3; CanFam3.1 (GCF_000002285.3)) more than 15 SNPs were identified (see table) with an estimated AUC value of more than 0.85.

Using logistic regression (SPSS v.20, method of exclusion of variables — likelihood ratio), it was found that three of the detected SNPs are sufficient to achieve a differentiation accuracy of the “WOLF/DOG” model of at least 98 %. In the future, it is necessary to test the differentiating potential of the identified SNPs on the formed wolf/dog samples for samples from Belarus and Russia.

References

1. Kipen V.N., Snytkov E.V., Patrin M.M. Ustanovlenie prinadlezhnosti biologicheskikh obrazcov k dikim ili domashnim predstavitel'yam vida *Canis lupus* s ispol'zovaniem SNP na osnovanii bioinformaticheskogo analiza // Sb. tez. nauch. konf. s mezhdunar. uchastiem, posv. 85-letiyu so dnya rozhdeniya akad. Y.P. Altukhova. Vavilov Institute of General Genetics RAS. Moscow. 11–14 Oct. 2022. P. 33.
2. Kipen V.N., Patrin M.M., Snytkov E.V., Verchuk A.N., Semak A.N. Analiz polimorfizma genov *ADCY8* i *RYR3* dlya ustanovleniya prinadlezhnosti biologicheskikh obrazcov k dikim ili domashnim predstavitel'yam vida *Canis lupus* // Genetika. 2023. Vol. 59, № 3. P. 336–344. DOI: 10.31857/S0016675823030062.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-8

COMPARATIVE GENETIC AND PHENOTYPIC ANALYSIS OF NEAR-ISOGENIC BARLEY LINES WITH ANTHOCYANIN GRAIN PIGMENTATION *

C. A. Molobekova^{1,2}, T. V. Kukoeva¹, O. Y. Shoeva^{1,2}

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

✉ k.molobekova@g.nsu.ru

Abstract

Here, near-isogenic barley lines (NILs) were used to study associations between genomic regions, responsible for anthocyanin synthesis in grain, and yield-related traits. Biochemical and yield component analyses showed that NILs differ from parental varieties in key agronomic traits. Genotyping by sequencing was performed for mapping the regions responsible for the observed phenotypic changes.

Near-isogenic lines differing from the recipient parent by a small genomic fragment are often used for genetic analyses of complex quantitative traits. In this work, we used high-throughput sequencing of purple- and blue-grained barley NILs to study the association between genomic regions with *Ant1*, *Ant2* and *HvMyc2* genes, responsible for anthocyanin grain pigmentation, and yield-related traits.

These barley NILs were derived in our laboratory from elite Siberian varieties Aley, Tanay, and Vorsinsky2 by crossing with PLP (purple lemma and pericarp) and BA (blue aleurone) lines and further marker-assisted selection for the anthocyanin grain pigmentation trait. Although six backcrosses with recipient parents were performed to achieve a high degree of genetic similarity, NILs could still inherit undesired linked loci from donor lines that may affect important agronomic traits.

Biochemical analysis of grain properties and yield parameter evaluation were conducted, which revealed that colored barley NILs actually differed from the parental varieties. First, the high anthocyanin and total phenolic content in the flour of NILs, except for some, was followed with increased antioxidant activity of NILs grain. We also found changes in yield parameters of NILs, either improvement or deterioration. Thus, these barley NILs represent a powerful material for studying the genetic basis of traits related to yield.

For mapping donor-derived genomic regions inherited by NILs we performed genotyping by sequencing (GBS). Libraries were sequenced using a 150-bp single-end protocol on Illumina MiSeq. The GBS data were processed using a pipeline created at ICG SB RAS. MorexV3 assembly was used as a reference genome for alignment and variant calling. From GBS data, we called 140–200 k SNPs for each sample and used them to estimate the genetic distance between lines. PCA and phylogram building results showed that NILs clustered with the corresponding parental varieties, indicating their high genetic similarity, while donor lines formed an outgroup. Using called SNPs, we intend to construct a high-density linkage map for NILs and estimate the size and localization of donor-derived regions with high accuracy. Further analysis of the genetic map is expected to reveal associations between genetic and the phenotypic differences we observed.

* The work was supported by RSF grant № 21-76-10024.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-9

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ CD8+ Т-КЛЕТОК, СПЕЦИФИЧНЫХ К ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОМУ АНТИГЕНУ HER-2/NEU, С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МРНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК И НЕЙРОННОЙ СЕТИ ERGO-II*

OBTAINING FULL SEQUENCES OF CD8+ T-CELL RECEPTORS SPECIFIC TO THE TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN HER-2/NEU USING SINGLE CELL MRNA SEQUENCING AND ERGO-II NEURAL NETWORK

С. Алрхмун^{1,2}, О. Ю. Перик-Заводская¹, М. О. Вольнец¹, Ю. А. Лопатникова¹, Ю. А. Шевченко¹,
М. С. Фишер¹, Р. Ю. Перик-Заводский¹, В. В. Курилин¹, А. Н. Силков¹, С. В. Сенников¹

¹Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

S. Alrhoun^{1,2}, O. Yu. Perik-Zavodskaja¹, M. O. Volynets¹, Yu. A. Lopatnikova¹, Yu. A. Shevchenko¹,
M. S. Fisher¹, R. Yu. Perik-Zavodskii¹, V. V. Kurilin¹, A. N. Silkov¹, S. V. Sennikov¹

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

✉ saleh.alrhoun1@gmail.com

Аннотация

Мембранный белок HER-2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) представляет собой опухоль-ассоциированный антиген, повышенная экспрессия которого наблюдается при различных типах карцином и ассоциирована, в частности, с наиболее агрессивным типом рака молочной железы и плохим клиническим прогнозом, что делает HER2/neu универсальной мишенью при разработке различных подходов иммунотерапии [1].

Abstract

The membrane protein HER-2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) is a tumor-associated antigen, the increased expression of which is observed in various types of tumors, and is associated, in particular, with the most aggressive types of breast cancer and poor clinical prognosis, which makes HER2/neu a universal target for the development of various immunotherapy approaches [1].

Мононуклеарные клетки (МНК) были выделены из периферической крови и разделены на две фракции: адгезивные, которые использовались для получения дендритных клеток, которые позже были загружены пептидом из антигена HER2/neu, и неадгезивные, которые были отсортированы магнитным способом для получения CD8+ клеток. После этого обе фракции совместно культивировали для активации анти-HER2/neu TCR, и культура проходила через два этапа сортировки, первый для получения CD8+ клеток, а второй для выделения HER2/neu-специфичных CD8+ клеток с использованием технологии Flex-T (BioLegend). Затем мРНК полученных CD8+ HER2/neu-специфичных клеток загружали в платформу для приготовления библиотек мультиомного профилирования единичных клеток и секвенировали полученные библиотеки на Illumina NovaSeq 6000 для получения полных последовательностей альфа- и бета-цепей TCR, происходящих из одной и той же клетки, что является огромным преимуществом по сравнению с массовым секвенированием. Кроме того, для каждой клетки мы получаем профилирование транскриптома для 397 генов, связанных с иммунным ответом, что помогает в процессе скрининга функциональных кандидатов на TCR. Затем результаты секвенирования были обработаны с помощью написанного в лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ скрипта (ClonoSort), который подсчитывает количество Т-клеток с идентичными Т-клеточными рецепторами.

ERGO-II — это основанный на последовательности нейросетевой предиктор связывания Т-клеточного рецептора (TCR) с пептидом, который использует методы, основанные на обработке естественного языка (NLP). ERGO-II использует CDR3 последовательности TCR β и TCR α , пептидную последовательность, гены V и J, МНС и тип Т-клеток (CD4/CD8) для прогнозирования связывания TCR и пептида. Используя ERGO-II, мы можем предсказать сродство полученных TCR к пептиду, что облегчает выбор между кандидатами из пула TCR в зависимости от желаемого применения [2].

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-65-00004, <https://rscf.ru/project/21-65-00004/>.

© С. Алрхмун, О. Ю. Перик-Заводская, М. О. Вольнец, Ю. А. Лопатникова, Ю. А. Шевченко, М. С. Фишер, Р. Ю. Перик-Заводский, В. В. Курилин, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2023

Результаты

Обработка данных секвенирования скриптом ClonoSort показала наличие трех доминантных клонотипов, каждый из которых экспрессировался на 7 клетках, плюс один клонотип экспрессировался на 5 клетках, 5 клонотипов каждый экспрессировался на 4 клетках и 17 клонотипов каждый экспрессировался на 3 клетках (рис. 1).

В результате анализа данных с помощью нейросети ERGO-II мы обнаружили широкое распространение полученных HER2/neu-специфичных TCR по показателю аффинности, поскольку существуют TCR с низким, средним и высоким сродством к пептиду HER2/neu (рис. 2), которые могут быть использованы в зависимости от желаемого применения.

Таким образом, мы можем заключить, что предложенный подход для получения полных последовательностей CD8+ T-клеточных рецепторов, специфичных к ассоциированному с опухолью антигену HER-2/neu, позволяет одновременно получить большое количество последовательной TCR, потенциально специфичных к целевому антигену, и провести их предварительный скрининг *in silico*, что открывает огромные возможности для создания TCR T-клеточных терапий.

Литература

1. Alrhoun S., Sennikov S. The Role of Tumor-Associated Antigen HER2/neu in Tumor Development and the Different Approaches for Using It in Treatment: Many Choices and Future Directions // Cancers. 2022.
2. Springer I., Tickotsky N., Louzoun Y. Contribution of T Cell Receptor Alpha and Beta CDR3, MHC Typing, V and J Genes to Peptide Binding Prediction // Front. Immunol. 2021.

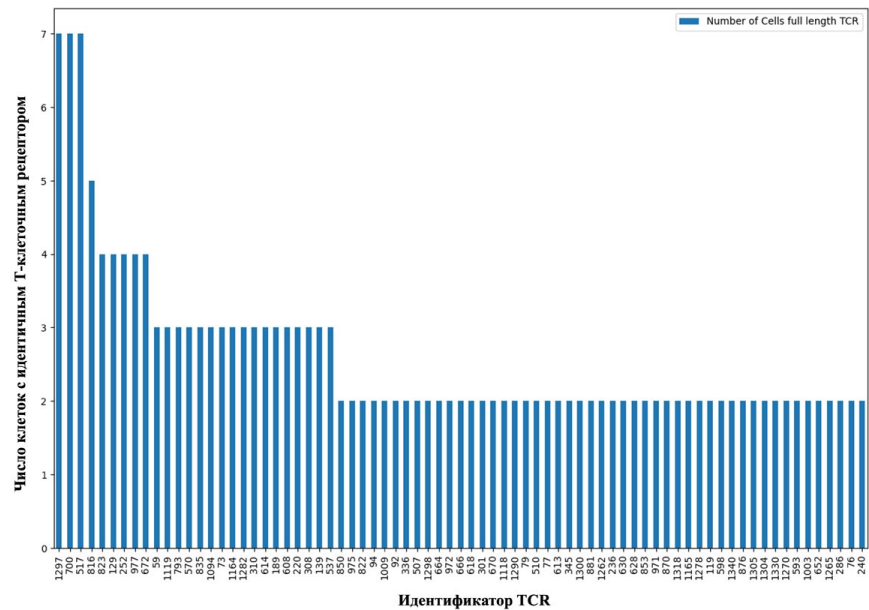


Рис. 1. Число клеток с идентичным Т-клеточным рецептором, ClonoSort

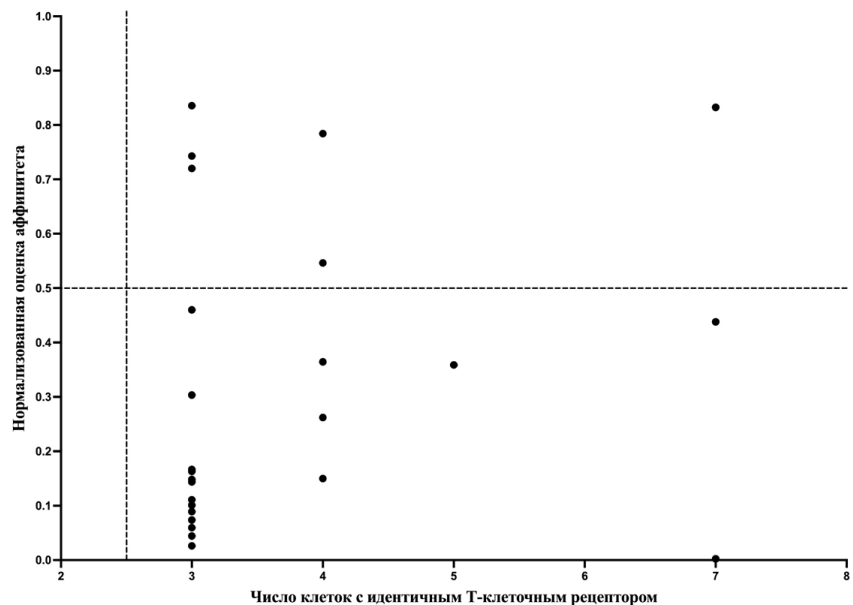


Рис. 2. Нормализованная оценка аффинитета, ERGO-II

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-10

ВЫЯВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ РЕФЕРЕНСНОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ИМПУТАЦИИ ДАННЫХ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОССИЯН НА ПРИМЕРЕ ВЫБОРКИ RUDDS*

IDENTIFICATION OF THE OPTIMAL REFERENCE PANEL FOR THE IMPUTATION OF RUSSIAN GENOTYPING DATA ON THE EXAMPLE OF THE RUDDS SAMPLE

А. А. Бердникова, Е. Е. Елгаева

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

A. A. Berdnikova, E. E. Elgaeva

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ a.berdnikova1@g.nsu.ru

Аннотация

Импутация — это метод, позволяющий восстанавливать недостающую информацию о генетических вариантах, которые не удалось генотипировать напрямую с помощью ДНК-микрочипов. В данном исследовании проводился поиск референсной панели, предпочтительной для импутации данных генотипирования российской популяции.

Abstract

Imputation is a method that allows you to restore missing information about genetic variants that were not genotyped directly from DNA microarrays. In this study was found a preferable reference panel for imputing Russian population genotyping data.

Идея метода импутации состоит в поиске гаплотипов, схожих в исследуемой (генотипированной с помощью ДНК-микрочипов) и референсной (имеющей данные полногеномного секвенирования) выборках. Импутация данных генотипирования является важным этапом полногеномного анализа ассоциаций (ПГА), поскольку она приводит к существенному увеличению количества изучаемых вариантов, что повышает разрешающую способность ПГА и увеличивает сопоставимость данных, полученных в разных когортах и/или с разных микрочипов.

В зарубежных исследованиях золотым стандартом является использование референсной панели TOPMed, однако переносимость этих рекомендаций на российские выборки изучена слабо. В связи с этим поиск оптимальной референсной панели для импутации данных российской популяции является актуальной проблемой.

В рамках этой работы была проведена импутация данных генотипирования 132 образцов из выборки RuDDS (Russian Disc Degeneration Study) [1], набираемой при участии ИЦиГ СО РАН. Импутация проводилась с использованием трех референсных панелей: HRC, 1000 Genomes и TOPMed — на серверах Michigan Imputation Server [2] и TOPMed Imputation Server [2]. После импутации были проведены статистическая обработка результатов и их сравнение, выполненные на языке программирования R, а также проверка качества полученных данных.

По результатам сравнительного анализа референсная панель TOPMed оказалась предпочтительнее остальных: для нее было выявлено наибольшее количество SNP с высоким качеством импутации ($R^2 > 0,7$) — 7558595 для TOPMed и 7358967 и 7343241 для HRC и 1000 Genomes соответственно.

Данные, полученные после генотипирования панелью TOPMed, успешно прошли проверку качества при анализе полигенной оценки роста и индекса массы тела индивидов из исследуемой выборки.

Литература

1. Leonova O. N. et al. A protocol for recruiting and analyzing the disease-oriented Russian disc degeneration study (RuDDS) biobank for functional omics studies of lumbar disc degeneration // Plos one. 2022. Vol. 17, № 5. P. e0267384.
2. Das S. et al. Next-generation genotype imputation service and methods // Nature genetics. 2016. Vol. 48, № 10. P. 1284–1287.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-20037.

© А. А. Бердникова, Е. Е. Елгаева, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ И МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ АФФИННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ В БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ *

USING NEURAL NETWORKS AND MOLECULAR DYNAMICS METHODS TO PREDICT BINDING AFFINITY IN PROTEIN-PROTEIN COMPLEXES

Е. А. Богданова, К. В. Шайтан, В. Н. Новоселецкий

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E. A. Bogdanova, K. V. Shaitan, V. N. Novoseletsky

Lomonosov Moscow State University

✉ abogdanova.bioinf@gmail.com

Аннотация

Аффинность связывания является важной характеристикой белок-белковых взаимодействий, ее определение имеет решающее значение для разработки лекарственных и биотехнологических препаратов. В данной работе представлен алгоритм на основе сверточных нейронных сетей, предсказывающий значение константы диссоциации в белок-белковых комплексах по их пространственной структуре, а также методы обработки и аугментации данных.

Abstract

Binding affinity is an important characteristic of protein-protein interactions, and its determination is important for the development of drugs and biotechnological preparations. This paper presents an algorithm based on convolutional neural networks that predicts the value of the dissociation constant in protein-protein complexes based on their spatial structure, as well as data processing and augmentation methods.

Для разработки терапевтических и диагностических средств, основанных на работе белок-белковых взаимодействий, решающее значение имеет достоверная информация об аффинности связывания между исследуемыми молекулами. Наиболее точными являются экспериментальные методы определения силы связывания, однако они имеют ряд ограничений, в частности, высокую трудоемкость и стоимость. Применение вычислительных методов позволит значительно уменьшить набор потенциальных соединений до подмножества наиболее оптимальных, которые будут использоваться в дальнейших лабораторных экспериментах. Таким образом, целью данной работы является разработка алгоритма, способного предсказывать силу связывания между белками в комплексах по их пространственным структурам.

Сборка обучающего набора данных происходила при использовании белковых баз данных, содержащих информацию о структуре и характеристиках белок-белковых комплексов (Protein Data Bank (PDB), PDB-Bind). Задачей алгоритма является предсказание значения константы диссоциации (K_d), которая обратно пропорциональна силе связывания.

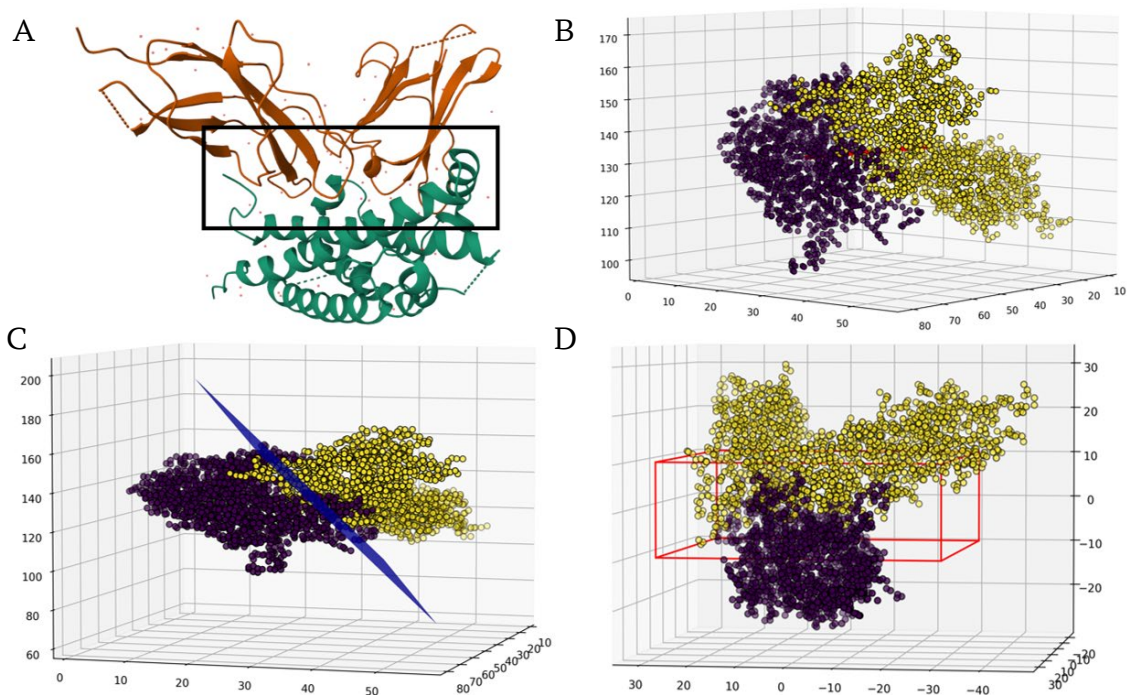
На первом этапе для используемых структур производилась локализация области связывания между молекулами внутри ячейки размера $21 \times 61 \times 61$: длина, ширина и высота (в ангстремах) соответственно (см. рисунок). Координаты атомов внутри ячейки переводились в трехмерный массив идентичного размера.

Чтобы отобразить свойства комплекса, к полученному массиву добавлялись каналы, отражающие возможные взаимодействия между атомами двух белковых молекул, такие как водородные связи, гидрофобные взаимодействия, стеклинг взаимодействия и др. Всего было добавлено 10 каналов.

В связи с ограниченным количеством структур комплексов с известными характеристиками связывания обучающий набор комплексов был расширен траекториями, полученными методами молекулярной динамики. Данный способ аугментации позволил добавить структуры с отличающимися конформациями взаимодействующих молекул и увеличить набор данных в несколько раз, что улучшает возможность поиска общих закономерностей взаимодействия вместо «запоминания» частных случаев расположения атомов.

В связи с форматом обучающих данных построение предсказательного алгоритма проводилось на базе сверточных нейронных сетей. Итоговая сеть состоит из трех сверточных и трех полносвязных слоев, на выходе последнего слоя выводится непосредственно значение pK_d (отрицательный десятичный логарифм K_d).

* Работа выполнена при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».
© Е. А. Богданова, К. В. Шайтан, В. Н. Новоселецкий, 2023



Этапы построения ячейки: *A* — комплекс с выделенной вручную областью связывания; *B* — атомы связывающихся молекул и вектор, соединяющий центры их масс (выделен красным); *C* — комплекс с рассчитанной разделяющей плоскостью (выделена синим); *D* — полученная ячейка, внутри которой выбираются атомы для массива

По итогу обученная модель на тестовом наборе данных показала значение корреляции Пирсона, равное 0,64 ($p\text{-value} = 4 \times 10^{-14}$), $RMSE = 1,47$.

По полученным значениям метрик качества разработанный алгоритм превосходит существующие методы предсказания константы диссоциации в белок-белковых комплексах, включая методы, основанные на анализе аминокислотных последовательностей [1], и модели по предсказанию связывания для комплексов с известными пространственными структурами, состоящих из двух молекул [2]. Этому удалось добиться в том числе с помощью обучения на комплексах, в которых связывание происходит между тремя и более молекулами.

Полученная модель может использоваться на ранних стадиях разработки лекарств, включающих в себя скрининг и оптимизацию соединений с заданной активностью и воздействием на целевой белок-мишень. Даже одна мутация в белке может изменить константу связывания на несколько порядков, а применение подобного алгоритма может значительно сократить количество необходимых экспериментов, так как заранее отсеиваются кандидаты с низким сродством.

Литература

1. Abbasi W.A., Yaseen A., Hassan F.U. et al. ISLAND: in-silico proteins binding affinity prediction using sequence information // *BioData Mining*. 2020. Vol. 13.
2. Romero-Molina S., Ruiz-Blanco Y.B., Mieres-Perez J. et al. PPI-Affinity: A Web Tool for the Prediction and Optimization of Protein–Peptide and Protein–Protein Binding Affinity // *Journal of Proteome Research*. 2022. Vol. 21. P. 1829–1841.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-12

**РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ
МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ**

**DEVELOPMENT OF A MODEL FOR PREDICTING PROTEIN DENATURATION TEMPERATURE
BY MACHINE LEARNING METHODS**

А. Д. Гавриленко

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

A. D. Gavrilenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ gavrilenkoalex154@gmail.com

Аннотация

В настоящей работе разработан метод PMTPred, предназначенный для предсказания температуры денатурации белков по их аминокислотным последовательностям, основанный на применении белковой языковой нейросетевой модели ESM-2 и нейросетевой регрессионной модели TabNet. ESM-2 применяется для расчета векторных представлений аминокислотных последовательностей, на основе которых осуществляется предсказание величины температуры денатурации с помощью TabNet.

Сравнение разработанного метода с одним из лучших существующих методов ProTstab2 показало, что PMTPred обладал меньшей ошибкой предсказаний. Корень квадратный среднеквадратичного отклонения (RMSE) между наблюдаемыми и предсказанными с помощью PMTPred значениями T_m был равен 5,76 °C, а в случае ProTstab2 значение RMSE составило 9,09 °C.

Abstract

In this study the PMTPred method was developed to predict protein melting temperature based on their amino acid sequences, using the protein language neural network model ESM-2 and the neural network regression model TabNet. ESM-2 is used to calculate vector representations of amino acid sequences, based on which the melting temperature is predicted using TabNet.

Comparison of the developed method with one of the best existing methods, ProTstab2, showed that PMTPred had a lower prediction error. The root mean square error (RMSE) between the observed and predicted T_m values using PMTPred was 5,76 °C, while for ProTstab2 the RMSE value was 9,09 °C.

Введение

Температура денатурации — это критическая температура, при которой от 50 % белка претерпевает переход из своего нативного состояния (пространственная структура белка необходимая для его функционирования) в денатурированное и выпадает в осадок. Белки, имеющие большую температуру денатурации, обладают большим периодом жизни и с меньшей вероятностью денатурируют под влиянием изменения условий функционирования в клетке.

Предсказание температуры денатурации белка как способ оценки его термостабильности является полезным решением в задачах белковой инженерии и биотехнологии. Температура денатурации может использоваться как один из критериев селекции вариантов дизайна белков без привлечения дополнительных времязатратных экспериментов термического профилирования.

Методы, решающие задачу предсказания термостабильности белка по нативной аминокислотной последовательности, представлены в ограниченном количестве. Одна из последних работ, в которой решали эту задачу, — это статья, посвященная модели ProTstab2 [1].

Авторы модели извлекают физико-химические дескрипторы из аминокислотной последовательности белка (доля гидрофобных, гидрофильных аминокислот и др.) и используют их как признаки для обучения модели градиентного бустинга.

В настоящей работе исследуются векторные представления предобученной белковой языковой модели ESM для извлечения полезных признаков белков с целью решения задачи предсказания температуры денатурации.

Авторами этой модели было показано, что выученные векторные представления белков передают информацию как о аминокислотной последовательности белка (представления кластеризируются в соответствии с физико-химическими характеристиками аминокислот), так и о третичной структуре белка — косинусное расстояние векторных представлений отражает структурное сходство белков в соответствии с классификацией Pfam и Scop.

Температура денатурации зависит от множества факторов, в том числе от характеристик аминокислотной последовательности белка и геометрии трехмерной структуры. Поэтому логичным шагом в разработке модели для предсказания температуры денатурации является использование векторных представлений белковых языковых моделей, так как они передают обобщающую информацию о белке.

Материалы и методы

1. Данные были получены из базы Meltome Atlas [2], включают 13 видов белков, 6 прокариот и 7 эукариот. Данные были предварительно обработаны (удалены дубликаты) и содержат характеристики температур денатурации около 35 тыс. белков. Термические профили были получены путем нагревания клеток и их лизатов. Образцы объединили по температуре, при которой белки выпадают в осадок, и разделили жидкостной хроматографией, затем идентифицировали аминокислотные последовательности белков с помощью метода масс-спектрометрии.

2. Для вычисления векторных представлений белков использовалась языковая модель ESM [3], которая была предобучена с использованием 250 млн последовательностей белков в результате решения задачи маскированного языкового моделирования. Векторное представление белков усредняется по представлениям аминокислот, итого белок кодируется вектором размерности 1280.

3. Кластеризация на основе выравнивания белковых последовательностей была выполнена с использованием программы CD-HIT [4].

4. В качестве регрессионной модели для предсказания температуры денатурации использовалась нейронная сеть Tabnet [5], реализующая механизм внимания для выделения важных признаков.

5. Подбор гиперпараметров при обучении модели производился с использованием библиотеки Optuna [6].

Результаты

1. Распределение данных в соответствии с температурой денатурации.

Минимальная температура денатурации составила 27,58 °С, максимальная — 98,94 °С. В зависимости от имеющейся температуры денатурации последовательности белков были разбиты на три категории: имеющие температуру ниже 45 °С, от 45 до 70 °С, свыше 70 °С.

Получилось следующее распределение частот белков в данных:

Белки первой категории — 7520, белки второй категории — 22322, белки третьей категории — 1954.

2. Кластеризация последовательностей.

В рамках анализа эволюционного разнообразия в данных была выполнена кластеризация на основе выравнивания белковых последовательностей с помощью CD-HIT с порогом идентичности 0,7. В результате кластеризации было получено 23248 кластеров белков, что говорит о том, что исходные данные включают эволюционно разнообразные белки.

3. Валидация модели.

Косинусное расстояние векторных представлений белков отражает их эволюционное родство. Если модель будет обучаться и тестироваться на родственных белках, есть риск получить завышенные метрики. С целью избежать утечки данных из тренировочной выборки в тестовую и разработать модель, обладающую достаточной обобщающей способностью, была проведена валидация с учетом эволюционного родства белков. В тренировочный набор данных брались белки из каждого кластера, при условии, чтобы белки из одного и того же кластера вместе попали или в тренировочную, или в валидационную выборку. Данная стратегия позволила предотвратить переобучение модели.

4. Обучение регрессионной модели TabNet.

Семейство моделей независимо обучалось при разбиении на тренировочную и валидационную выборки. Валидационные выборки не использовались в обучении, а применялись только для оценки точности моделей. Итого было независимо обучено 10 моделей в соответствии с количеством сформированных сбалансированных обучающих подвыборок, была выполнена их десятикратная валидация. Данный подход диверсифицирует модель и позволяет сделать ее более устойчивой к вариациям в исходных данных.

5. Анализ результатов работы модели.

Таблица 1

Точность модели на валидационных выборках

	Средняя квадратичная ошибка, °С	Среднеквадратичное отклонение, °С	Коэффициент детерминации, °С	Средняя абсолютная ошибка, °С	Корреляция Пирсона
Среднее	37,56	6,12	0,68	4,55	0,83
Дисперсия	1,1909	0,0971	0,0086	0,0701	0,0048

В табл. 1 приведены данные по точности модели предсказания температуры денатурации белков, полученные на валидационных выборках, не использованных при обучении. Следует обратить внимание, что низкая дисперсия значений показателей точности говорит об устойчивости предсказаний модели.

Итоговые предсказания на тестовой выборке вычислялись через усреднение по предсказаниям композиции из 10 моделей.

Таблица 2

Сравнение точности модели на тестовой выборке с Protstab2

Модель	Средняя квадратичная ошибка, °C	Среднеквадратичное отклонение, °C	Коэффициент детерминации, °C	Средняя абсолютная ошибка, °C	Корреляция Пирсона
ProTDet	33,23	5,76	0,70	4,25	0,84
ProTstab2	82,75	9,09	0,58	6,93	0,80

Из табл. 2 видно, что на основании метрик регрессии, рассчитанных на тестовой выборке, разработанная модель показывает лучшие результаты, по сравнению с упомянутой моделью Protstab 2.

Литература

1. Yang Y., Zhao J., Zeng L., Vihinen M. ProTstab2 for Prediction of Protein Thermal Stabilities // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. P. 2–11.
2. Jarzab A., Kurzawa N., Hopf T. et al. Meltome atlas-thermal proteome stability across the tree of life // Nat Methods. Vol. 17. P. 495–503.
3. Rives A., Meier J., Sercu T. et al. Biological structure and function emerge from scaling unsupervised learning to 250 million protein sequences // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2021. Vol. 118 (15). P. 1–10.
4. Limin F., Beifang N., Zhengwei Z. et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data // Bioinformatics. 2012. Vol. 28 (23). P. 3150–3152.
5. Arik S.O., Pfister T. TabNet: Attentive Interpretable Tabular Learning // ArXiv. Cornell University. 2019. P. 1–12.
6. Akiba T., Sano S., Yanase T. et al. Optuna: A Next-generation Hyperparameter Optimization Framework // Proceedings of the 25th ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery & Data Mining. 2019. P. 2623–2631. DOI: <http://dx.doi.org/10.1145/3292500.3330701>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-13

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ВО ВЛАГАЛИЩЕ
МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 16S РРНК У ЖЕНЩИН,
ПЛАНИРУЮЩИХ БЕРЕМЕННОСТЬ С ПОМОЩЬЮ ВРТ**

**THE RESULTS OF MICROORGANISM IDENTIFICATION IN THE VAGINA USING 16S RRNA
GENE SEQUENCING METHOD AMONG WOMEN PLANNING PREGNANCY THROUGH ASSISTED
REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES**

П. В. Горошко^{1,2}, Ю. Е. Бараблина¹

¹Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

²Генетическая лаборатория «Сербалаб», Санкт-Петербург

P. V. Goroshko^{1,2}, Yu. E. Barablina¹

¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

²Genetic Laboratory Serbalab, Saint Petersburg

✉ paulina_g@list.ru

Аннотация

Изменение состава микробиоты влагалища может оказывать отрицательное влияние на репродуктивную функцию и успех процедур вспомогательной репродукции. В исследовании с использованием метода секвенирования фрагментов генов 16s рРНК оценивалось таксономическое разнообразие микроорганизмов, присутствующих во влагалище пациенток, планирующих беременность с помощью ВРТ.

Abstract

Alterations in the vaginal microbiota composition can negatively impact reproductive function and the success of assisted reproductive procedures. Utilizing the 16S rRNA gene fragment sequencing method, we aimed to assess the taxonomic diversity of microorganisms present in the vaginal flora of patients undergoing IVF to conceive.

Введение

Влагалищный микробиом (ВМБ) — это сложная экосистема, играющая важную роль в здоровье женщин [1]. ВМБ состоит из многочисленных микроорганизмов, таких как бактерии, протисты, грибы и вирусы. Дисбаланс микробного сообщества во влагалище может быть связан с инфекциями, передающимися половым путем (вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусы папилломы человека (ВПЧ), бактериальный вагиноз), которые являются факторами риска бесплодия [2].

Для понимания структуры и функции микробного сообщества исследователи обращаются к методам секвенирования 16S рРНК, так как они предоставляют уникальную информацию о микробиоме влагалища, и сравнение результатов их применения позволяет лучше понять разнообразие и роль микробиома влагалища в репродуктивном здоровье женщин. Изменение состава микробиоты влагалища может оказывать отрицательное влияние на репродуктивную функцию и успех процедур вспомогательной репродукции, включая экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Нарушение баланса микроорганизмов может снизить вероятность успешной имплантации эмбриона, что напрямую влияет на результаты беременности.

Цель исследования — используя метод секвенирования фрагментов генов 16s рРНК, оценить таксономическое разнообразие микроорганизмов, присутствующих во влагалище пациенток, планирующих беременность с помощью ВРТ.

Материалы и методы

Проведен метагеномный анализ 16s влагалищной микробиоты у 45 женщин, планирующих беременность с помощью ВРТ.

Результаты

Секвенирование 16S показало, что ведущее положение занимал род *Lactobacillus* — 66,04 %, с доминированием *L.iners*, *L.jensenii*, *L.coleohominis*, *L.vaginalis* и *L.reuteri* обнаруживались в ряде проб, но их доля в генети-

ческом материале была минимальной. *Gardnerella vaginalis*, являющийся одним из ведущих участников в возникновении бактериального вагиноза (БВ), был обнаружен практически во всех образцах, однако его доля в микробном сообществе обычно составляла не более 7,05 %.

Обнаружились следовые количества родов *Prevotella* (3,72 %), *Sneathia* (0,79 %), *Mycoplasma* (0,50 %), *Staphylococcus* (0,30 %), *Bacteroides* (0,15 %), *Atopobium* (0,07 %), *Leptotrichia* (0,01 %).

Заключение

У женщин с бесплодием, включенных в данное исследование, наблюдались бессимптомные дисбиотические процессы, которые характеризовались определенными особенностями. В частности, во влагалищной микробиоте существенно снижалось количество микроорганизмов рода *Lactobacillus*. Среди них преобладали *Lactobacillus iners*, данный вид может самостоятельно выступать инициатором дисбиоза [4], в том числе за счет изменения функциональной активности рода *Lactobacillus*, не обеспечивая полную защиту и стабильность вагинального биотопа, что приводит к избыточному размножению условно-патогенных микроорганизмов.

Литература

1. Dekaboruah E., Suryavanshi M. V., Chettri D., Verma A. K. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role // Archives of microbiology. 2020. Vol. 202 (8). P. 2147–2167. DOI: 10.1007/s00203-020-01931-x.
2. Amabebe E., Anumba D. O C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of *Lactobacilli* // Frontiers in medicine. 2018. Vol. 5. P. 181. DOI: 10.3389/fmed.2018.00181.
3. Van Oostrum N., De Sutter P., Meys J., Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis // Human Reproduction. 2013. Vol. 28. DOI: 10.1093/humrep/det096.
4. Zheng N., Guo R., Wang J. et al. Contribution of *Lactobacillus iners* to Vaginal Health and Diseases: A Systematic Review // Front Cell Infect Microbiol. 2021. Vol. 11. P. 792787. DOI: 10.3389/fcimb.2021.792787.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-14

**PRIMERCOV — ПРОГРАММНЫЙ АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ВЫРОЖДЕННЫХ ПРАЙМЕРНЫХ СТРУКТУР*****PRIMERCOV — A BIOINFORMATICS TOOL FOR ANALYZING THE SPECIFICITY OF DEGENERATE
PRIMER STRUCTURES**Б. С. Гуков^{1,2}, И. Ф. Стеценко¹, А. Д. Мацвай¹, Г. А. Шипулин¹¹ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва²Московский государственный университет им. М. В. ЛомоносоваB. S. Gukov^{1,2}, I. F. Stetsenko¹, A. D. Matsvay¹, G. A. Shipulin¹¹Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow²Lomonosov Moscow State University

✉ bgukov@cspfmba.ru

Аннотация

Нами была разработана программа для решения задачи оценки специфичности праймеров, содержащих вырожденные позиции. Данный подход обеспечивает решение задачи меньшими вычислительными мощностями, демонстрируя при этом повышение качества определения локусов гомологии, по сравнению с подходом, основанным на Blast.

Abstract

We have developed a program to solve the problem of assessing the specificity of primers containing degenerate positions. This approach provides a solution to the problem with less computing power, while demonstrating an improvement in the quality of determining homology loci, compared with the Blast-based approach.

В современной молекулярной диагностике и исследованиях геномов ключевую роль играют праймеры — короткие одноцепочечные нуклеотидные последовательности, используемые для амплификации целевых участков ДНК или РНК в методах, основанных на ПЦР. Праймеры являются неотъемлемой частью молекулярной диагностики. Они позволяют выявлять генетические вариации, мутации, а также идентифицировать патогены и определенные гены, связанные с различными заболеваниями. Праймеры, используемые в молекулярной диагностике, должны быть тщательно проанализированы на полноту охвата целевой группы и специфичность. Полнота охвата, или покрытие, определяется как способность амплифицировать определенный локус генома всех организмов целевой группы. Недостаточность покрытия может привести к пропуску представителей целевой группы, что может негативно повлиять на надежность диагностики. И наоборот, способность праймеров амплифицировать локусы геномов организмов, не относящихся к целевой группе, приведет к появлению ложноположительных результатов при использовании таких систем.

Первичная оценка степени охвата и специфичности при дизайне праймерных систем решается *in silico*, чаще всего с использованием алгоритма локальных выравниваний Blast [1] и широкой базы данных геномных последовательностей. Однако программа не приспособлена к работе с вырожденными позициями внутри праймерных структур, поэтому при большом размере базы данных и/или большой степени вырожденности праймера расчеты могут занимать большое количество времени и в некоторых случаях приводить к потере локуса.

Для решения описанных задач мы разработали подход, основанный на алгоритме локальных выравниваний Смита — Ватермана [2, 3], оптимизированный для работы с вырожденными праймерными структурами и обеспечивающий информацию о предсказываемой эффективности отжига праймера без дополнительных вычислений.

Для сравнения эффективности работы программ использовались случайно сгенерированные праймерные структуры, а также: 1) 360 наборов данных, состоящих из случайно сгенерированных последовательностей, каждая из которых содержала целевой для праймеров локус; 2) 360 наборов данных, состоящих из случайно сгенерированных последовательностей, 10 % которых содержали целевые для праймеров локусы. Каждый набор данных имел комбинацию параметров: размера базы данных (1000, 10000, 10000), степени вырожденности прай-

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 388-00099-23-02.

© Б. С. Гуков, И. Ф. Стеценко, А. Д. Мацвай, Г. А. Шипулин, 2023

меров (1, 4, 16, 64, 256, 1024) и ошибок последовательности (Q-score 8, 10, 20, 30). Каждая комбинация была сгенерирована в нескольких повторностях для статистической обработки результатов.

В условиях задачи 1 PrimerCov, начиная со степени вырождения 16, при любой комбинации параметров показал выигрыш в производительности до 529 раз. Также программа показывает заметное (до 1,6 раза) увеличение охвата локусов, в особенности при высоком (Q-score 8 и 10) уровне ошибок в последовательностях.

В задаче 2 PrimerCov показывает ускорение времени исполнения (до 3 раз) на небольших и средних выборках, начиная со степени вырожденности 64. Однако на больших выборках программа работает не медленнее, чем Blast, только при степени вырождения более 1024 (ускорение до 11 раз). При этом чувствительность PrimerCov, как и в задаче 1, оказалась выше (до 1,6 раза), чем чувствительность Blast.

Данная работа представляет значимость для развития молекулярной диагностики, поскольку она может помочь решить задачу оптимизации праймерных структур, обеспечивая более высокую точность и полноту анализа, что, в свою очередь, поможет повысить качество молекулярной диагностики с использованием разрабатываемых систем.

В будущем планируется повысить скорость вычислений во второй задаче при помощи имплементации алгоритма быстрой проверки наличия локуса внутри последовательности.

Литература

1. Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // Journal of molecular biology. 1990. Vol. 215 (3). P. 403–410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
2. Smith T. F., Waterman M. S. Identification of common molecular subsequences // Journal of molecular biology. 1981. Vol. 147 (1). P. 195–197. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5).
3. Daily J. Parasail: SIMD C library for global, semi-global, and local pairwise sequence alignments // BMC Bioinformatics. 2016. Vol. 17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0930-z>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-15

РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ ДЛЯ АНАЛИЗА НЕСПЕЦИФИЧНОГО ОТЖИГА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ НА ГЕНОМАХ ОРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗЫ ДАННЫХ NCBI И ВЫРАВНИВАНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ АЛГОРИТМОМ BLAST

DEVELOPMENT OF A PROGRAM FOR ANALYSIS OF NONSPECIFIC PRIMER AND PROBE ANNEALING ON GENOMES OF ORGANISMS USING NCBI DATABASE AND ALIGNMENTS OBTAINED BY BLAST ALGORITHM

В. А. Дикая, В. А. Торопов, С. В. Суханицкий, Е. Д. Ермаченко, А. В. Лисок

ООО «Компания Алкор Био», Санкт-Петербург

V.A. Dikaya, V.A. Toropov, S.V. Sukhanitsky, E.D. Ermachenko, A.V. Lisok

LLC Group "Alcor Bio", Saint Petersburg

✉ vdikaia@alkorbio.ru

Аннотация

Анализ праймеров и зондов на специфичность — это важный этап при разработке системы для молекулярной диагностики инфекционных заболеваний с помощью ПЦР в реальном времени. В данной работе говорится о разработке программы для проверки отжига на геномах нецелевых организмов и приводятся преимущества относительно существующих аналогов.

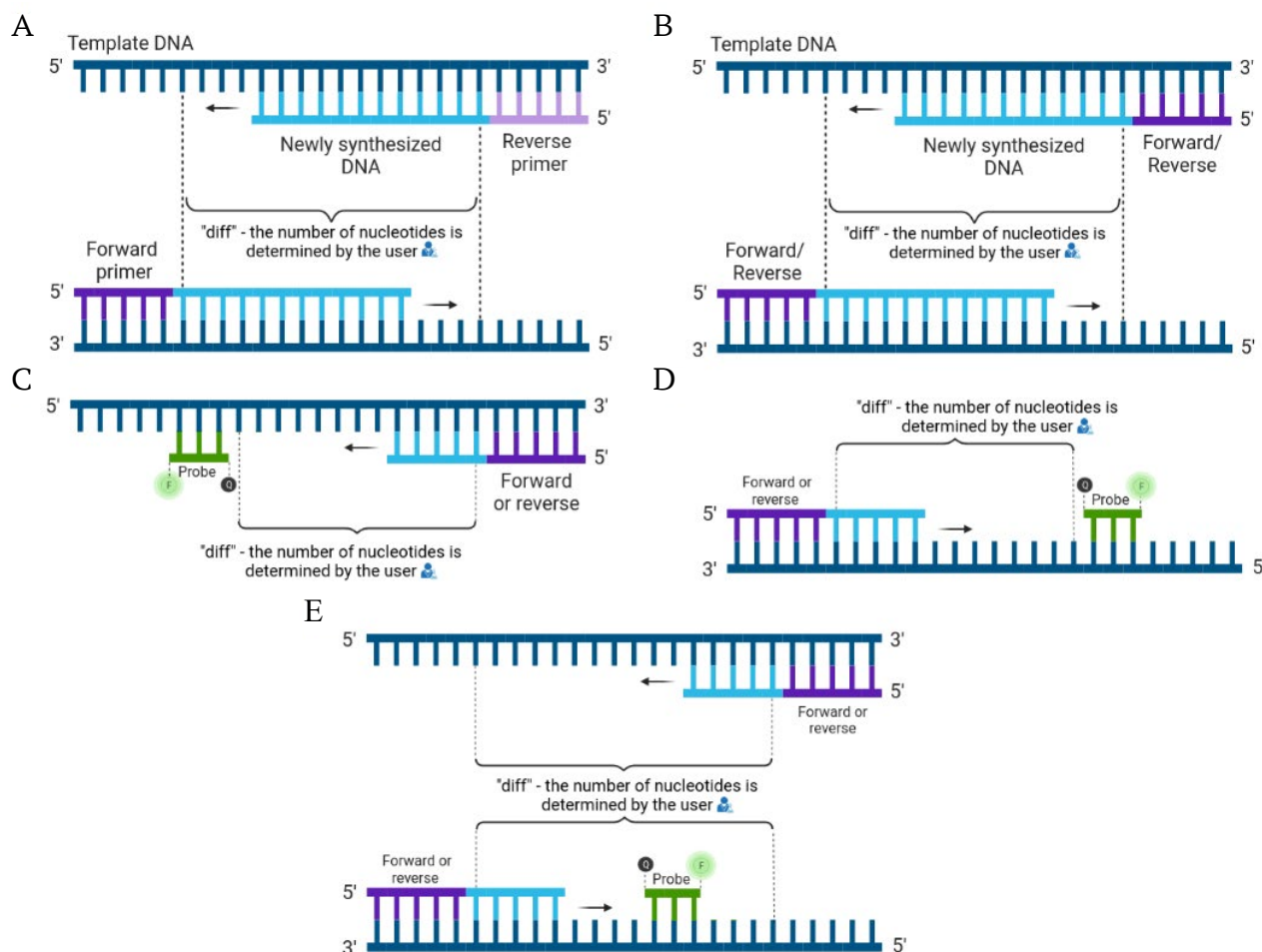
Abstract

Analysis of primers and probes for specificity is an important step in the development of a system for molecular diagnosis of infectious diseases by real-time PCR. This paper describes the development of a program to test annealing on genomes of non-target organisms and provides advantages relative to existing analogues.

Существует несколько программ, которые позволяют исследовать отжиг праймеров *in silico* на нецелевых организмах. Эталонном для поиска неспецифичных взаимодействий последовательностей считается PrimerBlast [1], он позволяет работать с базой данных NCBI и получать информацию о выравнивании исследуемых последовательностей геномов заданных организмов. Такой алгоритм как MultiPLX [2] ориентирован на поиск димеров между двумя короткими последовательностями. Однако вводить вручную каждую комбинацию довольно затруднительно, особенно с учетом разных направлений отжига прямых и обратных праймеров на цепи ДНК или РНК. К тому же выравнивание, например, зонда и только одного из праймеров может также повлиять на уровень флуоресценции, в случае если проба отжигается после затравки, что может приводить к неправильной диагностике инфекции. В связи с этим была разработана программа, которая позволяет исследовать большой набор олигонуклеотидов, автоматически перебирать их комбинации между собой, а также учитывать направление на цепях ДНК, чтобы определять разные случаи отжига на неспецифичной матрице, представленные на рисунке.

В качестве исходных данных на вход подаются два файла. Первый файл — это таблица Hit_Table.txt, полученная с помощью выравнивания алгоритмом Blast. Второй файл задается пользователем в формате FASTA, в котором находятся последовательности праймеров, зондов и их названия. В разработанной программе они проходят первичный анализ, где фильтруются по проценту отжига на матрице E-value, а также по наличию «висящих» нуклеотидов на 3'-конце для праймеров и 5'-конце для зондов.

После первичной обработки начинается второй этап анализа данных, где уже по координатам определяется направление последовательностей и количество нуклеотидов на цепи ДНК между ними. Исследователь задает порог — количество нуклеотидов между праймерами, которое он считает критическим для наработки продукта в нецелевом организме во время амплификации. По этому пороговому значению будут фильтроваться полученные данные после сопоставления олигонуклеотидов по ID организмов из NCBI, при необходимости можно сделать запрос в базу данных, чтобы получить имена организмов по их идентификационным номерам. На выходе программы пользователь получает несколько файлов: файл после первичного анализа (по необходимости указывается в опциях), файл после второго этапа анализа и файл со статистикой по найденным организмам, в которых отмечается возможный неспецифичный отжиг олигонуклеотидов. В настоящее время исходный код работает на языке Python3 с использованием следующих библиотек: Pandas, StringIO, itertools и glob.



Случаи отжига праймеров и зондов на нецелевом геноме. *A* — стандартный отжиг; *B* — один из олигонуклеотидов меняет направление, комбинации форвард-форвард, реверс-реверс; *C, D* — случаи, когда отжигается только один праймер, а за ним следует зонд; *E* — подслучай *A* и *B* с отжигом зонда

В ближайшем будущем будет разработан интерфейс для более удобного взаимодействия с пользователем, в том числе работающий на Windows. Данный алгоритм не является заменой для существующих программ, он должен ускорять работу с большими выборками последовательностей олигонуклеотидов и использоваться в качестве дополнения к имеющимся подходам анализа.

Литература

1. Ye J., Coughouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13. P. 13–134.
2. Ostoic J.A.R. Algebraic Analysis of Multiple Social Networks with multiplex // Journal of Statistical Software. 2020. Vol. 92 (11). P. 1–41.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-16

РЕКОНСТРУКЦИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ – NEMU ПАЙПЛАЙН***NEUTRAL MUTATION SPECTRA RECONSTRUCTION – NEMU PIPELINE**Б. Э. Ефименко^{1,2}, К. Ю. Попадьян¹, К. В. Гунбин^{1,2}¹*Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград*²*Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН, Москва*B. E. Efimenko^{1,2}, K. Yu. Popadin¹, K. V. Gunbin^{1,2}¹*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*²*Institute for Information Transmission Problems RAS, Moscow*

✉ bogdan-efimenko@list.ru

Аннотация

NeMu — это автоматизированный пайплайн, который реконструирует нейтральные мутационные спектры путем внутривидовых или межвидовых полиморфизмов. Пайплайн может быть использован для исследования мутационных спектров и естественного отбора в последовательностях генов и других элементов генома.

Abstract

NeMu is an automated pipeline that reconstructs neutral mutation spectra by analyzing intra-species or inter-species polymorphisms. The pipeline can be used for studying mutation spectra and natural selection in gene sequences and other genomic elements.

Нейтральные мутационные спектры (НМС), определяемые как вероятности замещения нуклеотида в заданном контексте нуклеотида, являются богатым источником информации о мутагенезе в различных типах тканей, включая раковые опухоли, человека и других модельных организмов. Для расширения применимости мутационных спектров на внутривидовом и сравнительно-видовом уровнях необходим универсальный и удобный подход. Эксперименты по накоплению мутаций являются фактическим стандартом для восстановления мутационных спектров. Однако данный тип эксперимента неприменим для немодельных видов, требует много времени и больших денежных затрат. Более того, было показано, что такие эксперименты зачастую значительно обогащены мутациями, фиксированными отбором [1].

Альтернативная стратегия оценки НМС — анализ естественных внутривидовых полиморфизмов, за исключением любых сайтов (например, некодирующих) и ветвей под потенциальным естественным отбором. Мы реализовали этот подход в автоматизированном инструменте NeMu [2], который может восстанавливать НМС для любого гена любого вида, используя все предоставленные пользователем последовательности всего за несколько минут. Для вычленения НМС из спектров, подверженных естественному отбору, в пайплайне реализованы фильтры и контроли качества, учитывающие всю имеющуюся эволюционную информацию: 1) теоретический уровень воздействия на приспособленность различных типов мутаций; 2) возможные селективные ограничения; 3) видоспецифический мутационный сдвиг; 4) строгость неравенства/необратимости скорости нуклеотидных замен на различных линиях и пр.

Качество реконструированных спектров было апробировано в рамках симуляционных экспериментов с параметрами эволюции, заданными случайным образом, а также с помощью использования программы PASTML, которая является стандартом в моделировании предковых последовательностей [3]. Сравнения мутационных спектров, восстановленных с помощью пайплайна NeMu, с симулированными или с мутационными спектрами, полученными другим методом (PASTML), демонстрировали косинусное сходство более 0,9, что говорит о высоком качестве применяемого подхода.

Возможность пайплайна отделять нейтральный спектр от спектра, на который оказывает влияние естественный отбор, с помощью моделирования эволюции с оцененными на реальных данных параметрами и на основе FMutSel модели была протестирована на митохондриальных генах человека и мыши. Для обоих организмов были получены типы однонуклеотидных замещений, которые значимо пере- или недопредставлены

* Данное исследование было поддержано из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. И. Канта, научный проект № 3313.

в определенных нуклеотидных контекстах по сравнению с моделированным нейтральным мутационным спектром. Для гена цитохром-с-оксидазы недопредставленными являются C[C>T]T и T[T>C]T ($p < 0,01$), что может говорить об отрицательном (стабилизирующем) отборе, а перепредставленными являются A[C>T]A, T[A>G]T и T[A>G]C ($p < 0,05$), что может говорить о положительном (движущем) отборе в сайтах, в которых происходят такие замещения.

Таким образом, NeMu pipeline предоставляет большие возможности для исследования мутационных спектров немодельных организмов, а также для оценки влияния естественного отбора на различные сайты различных генов.

Литература

1. Mahilkar A. et al. Selection in a growing colony biases results of mutation accumulation experiments // Scientific Reports. 2022. Vol. 12, № 1. P. 15470.
2. Nemu-pipeline. URL: <https://github.com/mitoclub/nemu-pipeline>.
3. Ishikawa S.A. et al. A fast likelihood method to reconstruct and visualize ancestral scenarios // Molecular biology and evolution. 2019. Vol. 36, № 9. P. 2069–2085.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-17

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА МЕТОДАМИ 16S NGS И ПЦР-РВ

QUANTIFICATION OF THE GUT MICROBIOTA BY 16S NGS AND QPCR

О. А. Злобовская, Е. В. Дементьева, А. С. Курносов, Е. В. Глазунова, И. О. Бикаева, В. В. Макаров, Г. А. Шипулин

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва

O. A. Zlobovskaya, E. V. Dementeva, A. S. Kurnosov, E. V. Glazunova, I. O. Bikaeva, V. V. Makarov, G. A. Shipulin

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow

✉ OZlobovskaya@cspmz.ru

Аннотация

Мы оценили точность количественной оценки методом секвенирования нового поколения (16S NGS) в сопоставлении с методом количественной ПЦР-РВ. Для этого была поставлена модельная задача по предсказанию обучающимися системами использованного набора для экстракции ДНК на основе данных количественного состава микробиоты. Линейный дискриминантный и многокомпонентный анализы обладали более высокой предсказательной способностью в случае метода ПЦР-РВ.

Abstract

We assessed the accuracy of quantification by 16S NGS sequencing versus qPCR. For this, a model task was set for two learning systems to predict the DNA extraction kit used based on the data on the quantitative composition of the microbiota. Both Linear Discriminant and Principal Component analyzes had a higher predictive power in the case of the RT-PCR method.

Введение и цель исследования

Для анализа разнообразия и состава микроорганизмов, обитающих в организме человека, широко распространено метагеномное профилирование с помощью секвенирования нового поколения (NGS), особенно наиболее бюджетный его вариант — секвенирование фрагмента гена 16S рРНК. По мере накопления информации о корреляции таксономического состава микробиоты со здоровьем растет интерес к количественной диагностике отдельных микроорганизмов. Теоретически с помощью метода 16S секвенирования можно оценить относительную представленность идентифицируемых таксонов и, зная общую бактериальную массу, рассчитать абсолютное содержание таксонов в образце. Ввиду большого количества стадий, на которых возможны искажения, и особенностей отдельных этапов методики мы проверили, насколько подобная оценка является сопоставимой со стандартной количественной методикой — количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Методы

Для экспериментов использовались фекалии пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и пациентов контрольной группы. Для выделения ДНК из фекалий использовали два набора QIAamp: Fast DNA Stool Mini Kit и PowerFecal DNA Kit (Qiagen). Набор PowerFecal отличается от FastStool наличием стадии механической гомогенизации образца, что приводит к увеличенному выходу ДНК грамположительных микроорганизмов.

Оценку таксономического состава осуществляли двумя методами: с помощью секвенирования нового поколения (16S NGS) и количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При анализе методом NGS амплифицировали и анализировали регионы V3-V4 гена 16S рРНК (MiSeq, Illumina, v3). Для анализа использовали пакет QIIME2 v.2022.2.0. Последовательности, прошедшие контроль качества (по 19 тыс. на образец), классифицировали по базам SILVA и RDP.

Анализ ПЦР-РВ проводили для семейств *Christensenellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*; родов *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Odoribacter* sp., *Oscillibacter* sp., *Ruminococcus* sp., *Subdoligranulum* sp.; видов *Enterococcus faecalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, а также определяли общее бактериальное число по амплификации консервативного участка гена 16S рРНК.

Для прямого сопоставления результатов ПЦР-РВ и NGS для данных NGS был проведен пересчет из относительного содержания таксонов в абсолютное по формуле: $\frac{N_{\text{такс}}}{N_{\text{общ}}} \cdot \text{ОБЧ}$, где $N_{\text{такс}}$ — количество прочтений соответствующего таксона в образце; $N_{\text{общ}}$ — общее количество прочтений для образца; ОБЧ — рассчитанное по данным ПЦР-РВ общее бактериальное число для образца.

Результаты

Для анализа результатов NGS были использованы две международные базы данных референсных геномов: SILVA и RDP. Относительное содержание некоторых таксонов существенно отличалось в зависимости от используемой базы данных. Ряд таксонов был определен только по одной из двух баз, для некоторых общих таксонов количество прочтений, которое определялось в одной базе, значительно отличалось от другой.

Для оценки корреляции пересекающихся таксонов был применен метод Спирмена. Значимая корреляция (коэффициент Спирмена более 0,45) наблюдалась в случае таксонов, для которых при этом была и максимальная корреляция между базами NGS (таксоны *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Odoribacter* sp.).

Линейный дискриминантный анализ (ЛДА) продемонстрировал более успешную способность системы, обученной на данных ПЦР-РВ, к различению образцов, выделенных разными наборами, чем на данных NGS. С помощью многокомпонентного (МГК) анализа результатов ПЦР-РВ образцы удалось различить по обоим главным компонентам, но при оценке методом NGS различия по первой главной компоненте не были обнаружены. Таким образом, обе модели продемонстрировали большую точность на основе данных, полученных методом ПЦР-РВ, притом что для ПЦР-РВ было использовано всего 11 таксонов, а не 130+, как для NGS.

Выводы

Сниженная точность количественной оценки методом 16S NGS может объясняться использованием универсальных вырожденных праймеров для амплификации всех таксонов, использованием ограниченного по протяженности региона для таксономической идентификации (в случае использования регионов V3–V4 идентификация рекомендуется до уровня семейств) и неточностями баз данных. Метод 16S NGS обоснованно использовать для первичной оценки таксономического состава.

Для количественной оценки и в качестве дополнительного подтверждающего метода при определении наличия корреляционной зависимости между исследуемыми группами для таксонов, выявленных с помощью 16S NGS, рекомендуется проводить анализ содержания ДНК методом ПЦР-РВ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-18

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ВЫВЕДЕНИЯ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ ИЗ ОРГАНИЗМА МЫШЕЙ***PHARMACOKINETIC STUDY OF LACTOBACILLI AND BIFIDOBACTERIA STRAINS IN MICE**

П. Ю. Зорук, Д. И. Болдырева, Е. И. Олехнович, К. М. Климина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю. М. Лопухина, Москва

P. Yu. Zoruk, D. Y. Boldireva, E. I. Olekhovich, K. M. Klimina

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow

✉ z-polly@mail.ru

Аннотация

Иммунологические подходы продемонстрировали высокую эффективность в борьбе с различными типами злокачественных опухолей. Однако у части пациентов не формируется ожидаемый положительный ответ на иммунотерапию. Данный эффект связывают в том числе с составом микробиоты кишечника [1–3]. На основе ранее проанализированных данных были выделены таксономические группы бактерий, связанные с положительным ответом на иммунотерапию рака, в частности, бактерии рода *Bifidobacterium adolescentis*. В пилотном эксперименте на лабораторных мышах (самки, C57Bl/6) нами было проведено исследование фармакокинетики выведения штаммов лактобацилл и бифидобактерий из организма мышей и биологического разнообразия в образцах фекалий.

Abstract

Immunological approaches have demonstrated high efficiency in the fight against various types of malignant tumors. However, some patients do not form the expected positive response to immunotherapy. Among other factors, this effect is also associated with the composition of intestinal microbiota [1–3]. Based on previously analyzed data, taxonomic groups of bacteria associated with a positive response to cancer immunotherapy were identified, in particular bacteria of genus *Bifidobacterium adolescentis*. In a pilot experiment on laboratory mice (females, C57Bl/6) we studied the pharmacokinetics of excretion of lactobacilli and bifidobacteria strains in mice and biological diversity in fecal samples.

Для проведения исследования были приготовлены лиофилизированные культуры штаммов *Lactocaseibacillus rhamnosus K32* и *Bifidobacterium adolescent 150*. Были сформированы 3 группы по 12 мышей (контрольная группа; группа мышей, которые получали лактобациллы; группа мышей, которые получали бифидобактерии). Каждой мышши в экспериментальной группе ежедневно вводили при помощи стерильного одноразового желудочного зонда по 0,3 мл лиофилизированной культуры, разведенной в фосфатно-солевом буфере (PBS), тогда как контрольная группа получала только PBS. Фекалии собирали до ввода бактериальной суспензии и на 5, 8, 12, 15, 19, 21, 25, 28 день эксперимента. Из фекалий выделяли ДНК и проводили секвенирование полной последовательности гена 16S рРНК с использованием технологии Oxford Nanopore. Для определения полного разнообразия секвенирование проводилось с 5 комбинациями различных праймеров.

По результатам секвенирования и анализа данных обнаружено, что введение лактобацилл и бифидобактерий мышам изменяло бактериальный состав микробиоты по сравнению с контролем. При этом комбинация различных праймеров на ген 16S рРНК существенно не влияла на бактериальное разнообразие внутри групп. Стоит отметить, что одна из комбинаций праймеров (8F-1492R) лучше всего определяла интересующий нас таксон *Bacteroides*. Также в образцах определяли наличие лактобацилл и бифидобактерий методом ПЦР. Показано, что лактобациллы сохраняются в организме в течение 2 недель после их приема, а бифидобактерии выводятся на 4-й день после их приема. Полученные результаты будут использованы для дальнейшего эксперимента по исследованию влияния анти-PD-1 и бактерий на меланому B16-F1 у мышшей линии C57Bl/6.

Литература

1. Gopalakrishnan V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients // Science. 2018. Vol. 359, № 6371. P. 97–103.
2. Matson V. et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients // Science. 2018. Vol. 359, № 6371. P. 104–108.
3. Sivan A. et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy // Science. 2015. Vol. 350, № 6264. P. 1084–1089.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 22-75-10029.
© П. Ю. Зорук, Д. И. Болдырева, Е. И. Олехнович, К. М. Климина, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-19

**ЭВОЛЮЦИЯ ОПУХОЛЕВОГО ГЕНА *AZGP1* И ФОРМИРОВАНИЕ ЕГО ФУНКЦИЙ,
СВЯЗАННЫХ С ОЖИРЕНИЕМ****THE EVOLUTION OF THE *AZGP1* TUMOR GENE AND THE FORMATION
OF ITS FUNCTIONS ASSOCIATED WITH OBESITY**Ф. Р. Кадирова¹, Е. А. Матюнина^{2,3}, Т. В. Курбатова⁴, А. П. Козлов²⁻⁴¹Санкт-Петербургский государственный университет²Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург³Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва⁴Биомедицинский центр, Санкт-ПетербургF. R. Kadirova¹, E. A. Matyunina^{2,3}, T. V. Kurbatova⁴, A. P. Kozlov²⁻⁴¹Saint Petersburg State University²Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint Petersburg³Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow⁴The Biomedical Center, Saint Petersburg

✉ kadirova.f.r@gmail.com

Аннотация

Обнаруженные многочисленные сходства между жировой тканью и опухолями позволяют предположить возможное эволюционное происхождение жировой ткани млекопитающих от некоторых наследственных доброкачественных мезенхимальных опухолей [1]. Были описаны гены, которые появились у рыб и экспрессировались в их опухолях [3], а их человеческие ортологи (*AZGP1* и др.) [2] приобрели функции, связанные с жировым органом.

Abstract

The numerous similarities found between adipose tissue and tumors suggest the possible evolutionary origin of mammalian adipose tissue from some hereditary benign mesenchymal tumors [1]. Genes that originated in fish and were expressed in their tumors have been described [3], and their human orthologues (*AZGP1* and others) [2] acquired functions associated with a fatty organ.

Ген *AZGP1* (*ZAG*) является одним из ключевых регуляторов в жировой ткани. Параллельно с этим он также участвует в развитии опухолей у людей. Молекулярные свойства данного гена опосредуют такие биологические процессы, как иммунный ответ, негативная регуляция пролиферации популяции клеток, активация липолиза в жировых клетках и др. Реализация таких функций геном *AZGP1* связана с тремя доменами: МНС I спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$ и иммуноглобулино-подобный домен. Так, открытая борозда между доменами МНС связывает гидрофобные лиганды, особенно полиненасыщенные жирные кислоты, посредством чего *ZAG* становится способным стимулировать липолиз в изолированных жировых клетках. Данный механизм опосредован цинком, который позволяет *ZAG* связываться с жирными кислотами и β -адренорецепторами. Нарушения гомеостаза цинка в организме негативно сказываются на липидном профиле и секреции цитокинов и связаны с риском развития рака.

Для объяснения становления данных функций, которые выполняет продукт гена *AZGP1* как в опухолях, так и в жировом органе, был проведен его филогенетический и экспрессионный анализ.

Анализ происхождения и эволюции функции оценивали по изменению последовательности гена *AZGP1* с использованием алгоритма tBLASTn, который ищет ортологи данного гена в других таксонах. Далее с помощью алгоритма MAFFT нуклеотидная, кодирующая и аминокислотная последовательности гена *AZGP1* и кодируемого им белка были выровнены с ортологичными последовательностями избранных таксонов. В результате с использованием программы MrBayes были получены филогенетические деревья, отражающие эволюционные связи между вышеперечисленными последовательностями гена *AZGP1* человека и его ортологами в избранных таксонах.

Как видно на рис. 1, ген *AZGP1* имеет ортологи во всех анализируемых таксонах, причем его ортологи располагаются на филогенетическом дереве в соответствии с появлением в данном таксоне функций гена *AZGP1*, а именно, домен, участвующий в иммунном ответе, появляется еще у рыб. Структуры, связанные с регулированием липолиза, в жировых тканях появляются значительно позже.

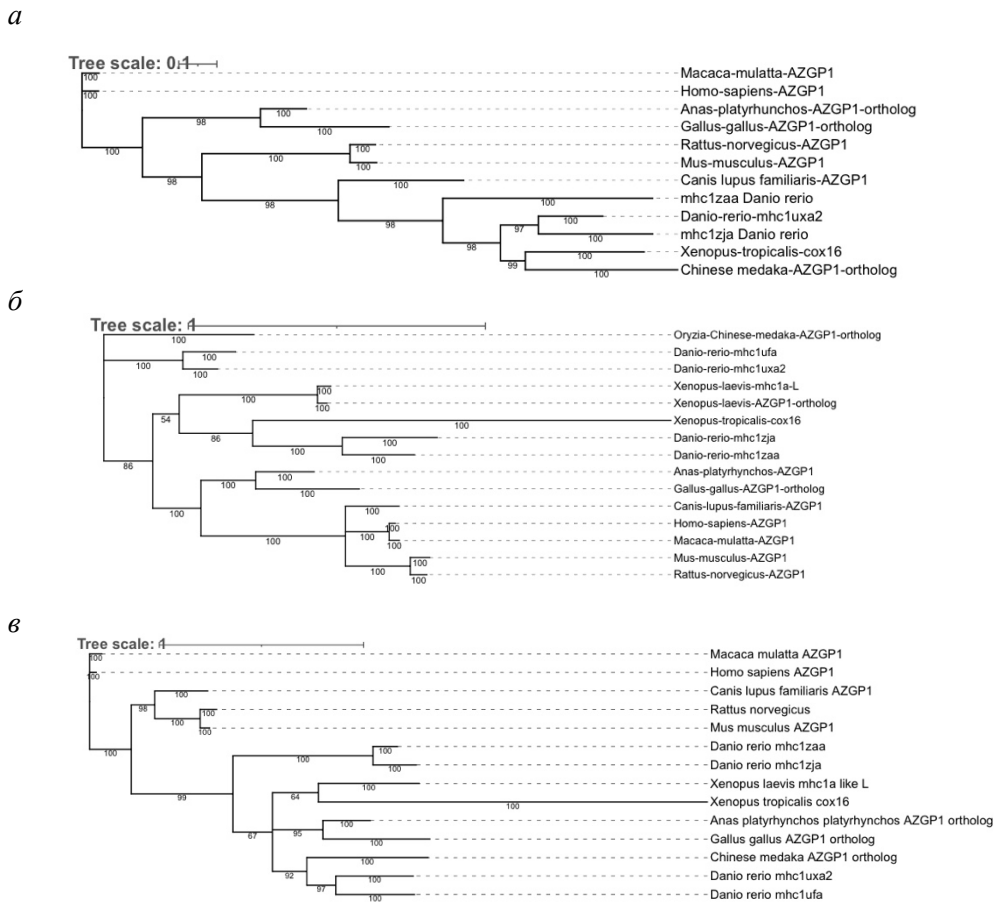


Рис. 1. Филогенетическое дерево нуклеотидной (а), кодирующей (б) и аминокислотной (в) последовательностей гена *AZGP1* человека и его ортологов в избранных таксонах

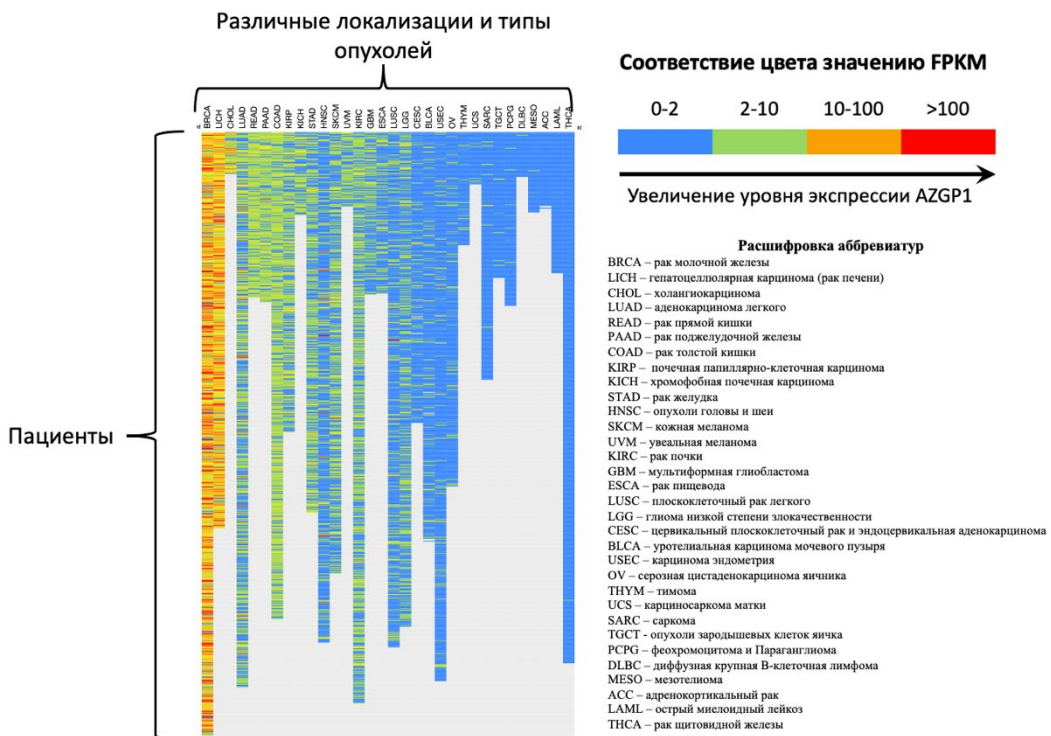


Рис. 2. «Тепловая карта» (heatmap), демонстрирующая уровень экспрессии *AZGP1* у пациентов с различными опухолями (локализациями и типами)

Для анализа связи данного гена с опухолью и ожирением одновременно была проанализирована экспрессия гена *AZGP1* в опухолях и жировой ткани. Значения уровней экспрессии гена были взяты из базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas), которая содержит данные по 20000 пациентов с 33 различными локализациями и типами опухолей. Для анализа уровня экспрессии по пациентам была сформирована «тепловая карта» (heatmap) с помощью алгоритма Morpheus. Сверху вниз цветом обозначены уровни экспрессии гена *AZGP1* в опухолях различных пациентов, сверху — аббревиатура заболевания (расшифровка приведены ниже).

Снижение экспрессии изучаемого гена коррелирует с малой степенью дифференциации клеток и поддерживает эпителиально-мезенхимный переход. Высокий уровень экспрессии поддерживает эпителиальный фенотип. Нами было показано, что уровень экспрессии гена *AZGP1* в некоторых типах опухолей (рак молочной железы, рак простаты, рак поджелудочной железы и др.) существенно повышен среди пациентов, что коррелирует с благоприятным прогнозом для пациента.

Экспрессия в жировой ткани (PRJNA237271) значительно снижается при ожирении, что говорит о влиянии нарушения функции *AZGP1* на развитие данной патологии (рис. 3).

Можно заключить, что ген *AZGP1* возникает у рыб и экспрессируется в опухолевых тканях. Первоначальная функция связана с иммунным ответом. Дальнейшая его эволюция связана с приобретением функции в жировом органе при его формировании из наследуемых опухолей.

Литература

1. Kozlov A.P. Mammalian tumor-like organs. 1. The role of tumor-like normal organs and atypical tumor organs in the evolution of development (*carcino-evo-devo*) // Infect Agents Cancer. 2022. Vol. 17, № 2.
2. Kozlov A.P. The Theory of *Carcino-Evo-Devo* and Its Non-Trivial Predictions // Genes. 2022. Vol. 13. P. 2347.
3. Matyunina E.A., Emelyanov A.V., Kurbatova T.V. et al. Evolutionarily novel genes are expressed in transgenic fish tumors and their orthologs are involved in development of progressive traits in humans // Infectious Agents and Cancer. 2019. Vol. 14.

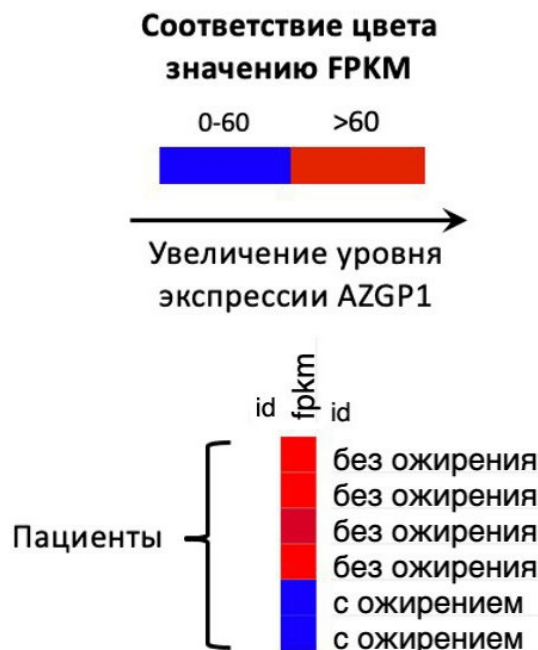


Рис. 3. «Тепловая карта» (heatmap), демонстрирующая уровень экспрессии *AZGP1* в жировой ткани у пациентов с ожирением и без ожирения

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-20

**ПОИСК УНИВЕРСАЛЬНЫХ МЕТАГЕНОМНЫХ МАРКЕРОВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ОТВЕТОМ НА ИММУНОТЕРАПИЮ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАКА***

**SEARCH FOR UNIVERSAL METAGENOMIC MARKERS OF THE GUT MICROBIOTA ASSOCIATED
WITH THE RESPONSE TO IMMUNOTHERAPY OF VARIOUS TYPES OF CANCER**

В. А. Канаева^{1,2}, Е. И. Олехнович¹

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
им. акад. Ю. М. Лопухина, Москва

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный

V.A. Kanaeva^{1,2}, E.I. Olekhovich¹

¹Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ vera.a.kanaeva@gmail.com

Аннотация

В ходе таксономического анализа образцов кишечной микробиоты пациентов с различными видами рака, проходящих лечение иммунотерапией, были выявлены потенциальные биологические маркеры, такие как *Faecalibacterium prausnitzii*, связанные с положительным исходом лечения, и *E. coli*, связанные с отрицательным исходом.

Abstract

During the taxonomic analysis of intestinal microbiota samples of patients with various types of cancer undergoing immunotherapy potential biological markers, such as *Faecalibacterium prausnitzii* associated with a positive outcome of treatment and *E. coli* with a negative outcome were identified.

Известно, что микробиота желудочно-кишечного тракта влияет на развитие и функцию врожденного и адаптивного иммунитета. Было показано, что состав микробиоты пациентов также связан с противоопухолевым иммунитетом и эффективностью иммунотерапии.

Целью нашей работы является проверка гипотезы об универсальности механизма влияния микробиоты кишечника на исход иммунотерапии независимо от типа рака. Для исследования из базы NCBI было загружено 115 образцов кишечной микробиоты больных раком: гепатоцеллюлярной карциномой, раком различных частей ЖКТ (толстой и прямой кишки, поджелудочной железы), раком легких, предстательной железы и яичников. Для всех образцов был проведен контроль и фильтрация человеческой ДНК. После проведения процедур таксономической аннотации и статистической обработки было выявлено 19 бактерий, различающих экспериментальные группы пациентов с разным исходом иммунотерапии независимо от типа рака в пяти наборах данных. Воспроизводимыми биомаркерами, связанными с отсутствием ответа на иммунотерапию, в большинстве наборов данных была *E. coli*, тогда как *Faecalibacterium prausnitzii* и *Eubacterium eligens* были биомаркерами позитивного исхода лечения. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о существовании универсального механизма вовлеченности микробиоты кишечника в ответ на иммунотерапию различных видов рака.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-75-10029.

© В. А. Канаева, Е. И. Олехнович, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-21

**ПОИСК И ОПИСАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ХРОМОСОМЕ 1А
У БОЛЬШОЙ СИНИЦЫ (*PARUS MAJOR*) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА HI-C *****DISSECTING THE STRUCTURE OF THE CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS
IN CHROMOSOME 1A IN GREAT TITS (*PARUS MAJOR*) USING HI-C TECHNIQUE**С. Ю. Козырева^{1,2}, М. М. Гридина¹, А. А. Торгашева¹, В. С. Фишман¹, К. С. Задесенец¹, Л. П. Малиновская¹¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университетS. Yu. Kozyreva^{1,2}, M. M. Gridina¹, A. A. Torgasheva¹, V. S. Fishman¹, K. S. Zadesenets¹, L. P. Malinovskaya¹¹Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University

✉ s.kozyreva@g.nsu.ru

Аннотация

В популяции большой синицы (*Parus major*) был выявлен полиморфизм по комплексной перестройке в хромосоме 1А. Перестройка включает в себя инверсию и районы с вариациями числа копий, предположительно могла составлять около 3,5 Мб. Используя метод Hi-C, мы определили границу инверсии с точностью до 1000 п. о. и разработали подход, с помощью которого нам удалось найти дополнительные 15 Мб геномных последовательностей в перестроенной хромосоме 1А большой синицы.

Abstract

Polymorphism caused by complex rearrangement on chromosome 1A has been identified in the population of the Great Tit (*Parus major*). Chromosomal rearrangement involves large inversion and regions with copy number variations, potentially spanning around 3.5 Mb. Using Hi-C technique we determined the inversion breakpoints with an accuracy of 1000 bp and developed an approach that allowed to discover additional 15 Mb of genomic sequences in the rearranged chromosome.

Инверсии играют важную роль в эволюции хромосом, ограничивая поток генов в популяции. Они являются наиболее распространенными хромосомными перестройками в достаточно консервативных кариотипах птиц. Исследование инверсий важно для понимания механизмов видообразования и адаптации.

Ранее в популяции на территории Нидерландов [1] был выявлен полиморфизм по комплексной перестройке в хромосоме 1А большой синицы (*Parus major*). Согласно данным анализа гетерозиготности и распределения количества однонуклеотидных полиморфизмов, перестройка предположительно включает в себя большую (более 90 % длины хромосомы) инверсию. Один из ее концов, вероятно, находится вблизи комплекса, для которого характерна вариация числа копий (copy number variants, CNV) [1]. При этом у 96 % гетерозигот по комплексной перестройке в хромосоме 1А число копий этого комплекса было существенно выше, чем у гомозигот по нормальной хромосоме 1А. Общая длина последовательностей, дополнительно присутствующих в перестроенной хромосоме, предположительно могла составлять около 3,5 Мб [1], что затрудняет определение точных границ инверсии.

С помощью методов цитогенетического анализа наши коллеги из Института цитологии и генетики СО РАН обнаружили полиморфизм, предположительно, по той же хромосомной перестройке в хромосоме 1А, у синиц из новосибирской популяции. Однако длина перестроенной хромосомы была примерно в 1,5 раза больше, чем нормальной, т. е. увеличение длины гомолога, несущего инвертированный аллель, составляло до 30 Мб — существенно больше, чем увеличение на 3,5 Мб, описанное раньше. Таким образом, структура этой перестройки, точные границы инверсии, а также генетическое содержание инсерции неизвестны.

Для исследования структуры такой сложной перестройки использовались методы Hi-C-секвенирования [2] и полногеномного секвенирования парными короткими прочтениями. С помощью метода Hi-C была построена карта контактов хроматина для синиц, гетерозиготных по комплексной перестройке в хромосоме 1А, и синиц дикого типа. Уточнена сборка хромосомы 1А большой синицы и определены координаты инверсионного полиморфизма с точностью до 1000 пар оснований.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-14-00182.

Для того чтобы определить нуклеотидную последовательность неизвестной инсерции, был разработан подход для поиска дополнительных последовательностей, отсутствующих в референсном геноме, с использованием данных полногеномного и Hi-C-секвенирования. С помощью данного подхода и анализа копийности CNV в гаплотипе с комплексной хромосомной перестройкой удалось найти дополнительные 15 Мб в перестроенной хромосоме 1A большой синицы.

Литература

1. Da Silva V.H. et al. The Genomic Complexity of a Large Inversion in Great Tits // *Genome Biology and Evolution*. 2019. Vol. 11, № 7. P. 1870–1881. DOI: 10.1093/gbe/evz106.
2. Lieberman-Aiden E. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science*. 2009. Vol. 326, № 5950. P. 289–293. DOI: 10.1126/science.1181369/suppl_file/lieberman-aiden.som.pdf.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-22

МНОГОУРОВНЕВАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРИПАДКОВ ***MULTILEVEL MATHEMATICAL MODEL OF EPILEPTIC SEIZURES**П. Ю. Кондрахин¹, Ф. А. Колпаков^{1,2}¹Научно-технологический университет «Сириус», Сочи²Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, НовосибирскP. Yu. Kondrakhin¹, F. A. Kolpakov^{1,2}¹Sirius University of Science and Technology, Sochi²Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Novosibirsk

✉ kondrakhin.py@gmail.com

Аннотация

В работе представлена разработанная на основе модульного подхода математическая модель эпилептических припадков, полученная с помощью объединения и модификации существующих моделей эпилепсии, которая впервые позволяет исследовать динамику возникновения, распространения и затухания приступов одновременно на клеточном и региональном уровнях организации мозга.

Abstract

The paper presents novel developed modular mathematical model of epileptic seizures, obtained by combining and modifying existing models of epilepsy, which for the first time makes it possible to simulate the dynamics of seizure onset, propagation and termination simultaneously at the cellular and regional levels of brain organization.

В настоящее время существует три подхода к моделированию мозга: наноскопический (клеточный), в рамках которого делается акцент на отдельной нервной клетке; микроскопический (популяционный), при котором моделируются взаимодействия между клеточными популяциями; мезоскопический (региональный), рассматривающий не отдельные нейроны, а целые области мозга.

Применимость микроскопического подхода сильно ограничена высокой вычислительной сложностью соответствующих моделей. Мезоскопический подход осуществим уже сегодня и способен генерировать электрофизиологические сигналы мозга пациента, схожие с экспериментальными. Однако используемые в подходе модели зачастую основаны лишь на математических рассуждениях, и, как следствие, используемые в них параметры лишены биологической интерпретации, что существенно затрудняет обоснование получаемых результатов. Модели наноскопического подхода позволяют моделировать биофизические процессы, происходящие в отдельном нейроне, и в большинстве случаев обладают выраженным биологическим смыслом. Однако они не способны воспроизводить электрофизиологические сигналы мозга, из-за чего слабо применимы к реальным пациентам.

Больших успехов в мезоскопическом подходе добился проект The Virtual Brain (TVB) [1], находящийся на клиническом испытании, где моделирование мозга используется для прогноза результатов при хирургии эпилепсии. В то же время существует большое количество данных по геному, транскриптому, липидому, говорящих о том, что на возникновение эпилептических припадков также оказывают влияние факторы наноскопического уровня: динамика клеточных рецепторов, генные и метаболические сети, пути передачи сигнала в нейроне и т. д. Однако «наноуровень» совершенно никак не учитывается в моделях TVB.

Для описания наноскопического уровня хорошо подходит разработанная компанией ООО «Биософт.Ру» платформа BioUML [2], используемая в ряде крупных проектов для построения модульных компьютерных моделей биологических систем.

Представляет интерес воспроизведение в BioUML ряда существующих моделей эпилепсии, позволяющих качественно воспроизводить наблюдаемые во время припадков феномены, с последующим соединением мезоскопического и наноскопического уровней, минуя микроскопический. Для этого необходимо разработать способ передачи рассчитанных характеристик отдельных нервных клеток на уровень нейронных полей. Это позволит

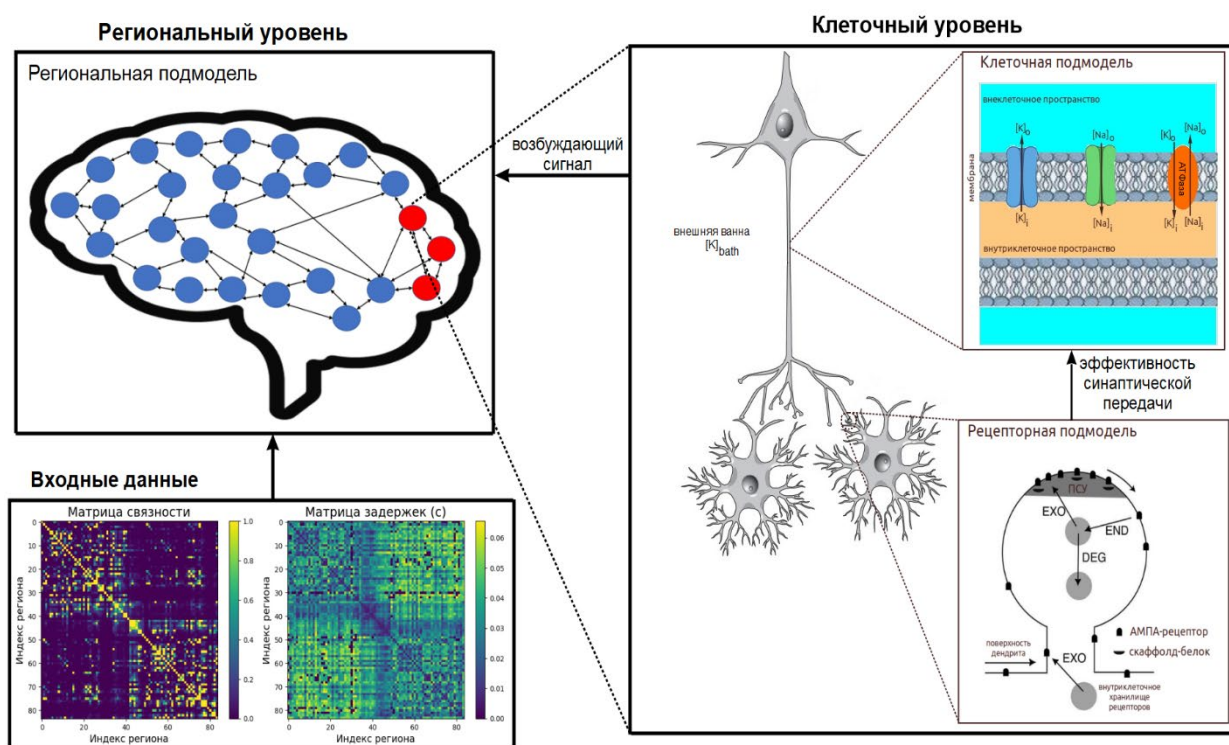
* Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-10-2021-093; проект № СМБ-RND-2123).

© П. Ю. Кондрахин, Ф. А. Колпаков, 2023

получить модель нейронных полей, учитывающую взаимодействия внутри отдельных нейронов, но избавленную от сложностей описания взаимодействий клеточных популяций.

Таким образом, целью данной работы стало построение многоуровневой математической модели эпилептических припадков, способной генерировать данные регионального уровня с учетом биофизических процессов, происходящих в отдельных нейронах. Для достижения поставленной цели на платформе BioUML были воспроизведены результаты ряда существующих моделей эпилепсии регионального и клеточного уровней, на основании которых была проведена разработка и построение многоуровневой модели.

Построенная многоуровневая модель содержит одну региональную подмодель, моделирующую взаимодействия между взаимосвязанными регионами мозга, каждому региону которой соответствует клеточная подмодель, рассчитывающая динамику концентраций ионов, и рецепторная подмодель, определяющая динамику перемещений клеточных АМПА-рецепторов (см. рисунок). При этом рецепторная подмодель определяет эффективность синаптической передачи соответствующей клетки, а клеточная подмодель является источником возбуждения для соответствующего региона.



Структура многоуровневой модели

Показано, что динамика используемых в структуре многоуровневой модели отдельных подмоделей соответствует динамике исходных моделей, авторы которых проводили их валидацию через сравнение с экспериментальными данными. Приведено теоретическое обоснование связей, объединяющих подмодели в единую структуру.

Литература

1. Sanz L. P., Knock S. A., Woodman M. M. et al. The Virtual Brain: a simulator of primate brain network dynamics // *Frontiers in Neuroinformatics*. 2013. Vol. 7, № 10.
2. Kolpakov F., Akberdin I., Kiselev I. et al. BioUML — towards a universal research platform // *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50, № W1. P. W124–W131.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-23

**РАЗЛИЧИЯ МУТАЦИОННОГО СПЕКТРА МТДНК ТЕРМИТНЫХ И НЕТЕРМИТНЫХ ТАРАКАНОВ
АССОЦИИРОВАНЫ С ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ**

**DIFFERENCES IN THE MTDNA MUTATION SPECTRUM OF TERMITE AND NON-TERMITE
COCKROACHES ARE ASSOCIATED WITH LIFE EXPECTANCY**

А. А. Кошель¹, Г. Г. Осадчий¹, А. А. Михайлова², А. Г. Михайлова¹,
Б. Э. Ефименко¹, К. В. Гунбин¹, К. Ю. Попадьин³

¹*Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград*

²*Институт эволюции и биоразнообразия Мюнстерского университета, Германия*

³*Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария*

A. A. Koshel¹, G. G. Osadchiy¹, A. A. Mikhailova², A. G. Mikhailova¹, B. E. Efimenko¹, K. V. Gunbin¹, K. Yu. Popadin⁵

¹*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*

²*Institute for Evolution and Biodiversity, University of Münster, Germany*

³*Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland*

✉ anastasiakoschel2001@gmail.com

Аннотация

Мы проанализировали мутационные спектры гена *COX1* для 16 видов термитных и 7 видов нетермитных тараканов, используя филогенетические методы, и обнаружили, что социальные термиты имеют более частые замены Ah > Gh по сравнению с менее социальными термитами и тараканами, что может свидетельствовать о влиянии продолжительности жизни на мутационный спектр мтДНК.

Abstract

We analyzed the mutational spectra of the *COX1* gene for 16 species of termite cockroaches and 7 species of non-termite cockroaches using phylogenetic methods and found that social termites have more frequent Ah > Gh substitutions compared to less social termites and cockroaches, which may indicate the influence of life expectancy on the mutational spectrum of mtDNA.

В результате недавних исследований было обнаружено, что мутагенез мтДНК чувствителен к митохондриальному возрастному окислительному повреждению, которое индуцирует дезаминирование аденина в гуанин преимущественно на одноцепочечной тяжелой цепи мтДНК (далее h) во время асимметричной репликации.

Мы выдвигаем гипотезу о том, что спектр мутаций мтДНК может различаться у короткоживущих и долгоживущих насекомых, среди которых нетермитные и термитные тараканы являются лучшими группами для анализа. Как следствие стратегии эусоциальности, высокая продолжительность жизни термитных тараканов может оказывать существенное влияние на мутационный спектр митохондриальной ДНК.

Мы получили мутационный спектр (вероятность мутации одного нуклеотида в любой другой нуклеотид) для каждого из 16 видов термитных тараканов и 7 видов нетермитных тараканов из всех доступных внутривидовых последовательностей гена *COX1*. Используя базу данных MIDORI Reference 2 с внутривидовыми полиморфизмами и ранее разработанный пайплайн, мы реконструировали внутривидовую филогению с использованием аутгрупп последовательности (ближайший вид к анализируемому), реконструировали мутационные спектры предковых состояний во всех позициях во всех внутренних узлах дерева и получили список однонуклеотидных замен для каждого из видов. Мы нормализовали наблюдаемые частоты замен по содержанию нуклеотидов в третьей позиции четырежды вырожденных синонимичных сайтов. Мы выровняли митохондриальные кодирующие белок гены, используя MAFFT, реконструировали межвидовую филогению и предковые состояния, используя IQ-TREE.

Если замены Ah > Gh чаще встречаются у долгоживущих насекомых, мы ожидаем, что для тараканов характерна низкая частота Ah > Gh. Мы реконструировали мутационные спектры мтДНК для 21 вида, выбирая виды с секвенированным геном *COX1* из MIDORI Reference 2. Также мы реконструировали филогенетические деревья и воссоздали предковые состояния внутренних узлов с целью получения списка произошедших замен. Данные были отфильтрованы для работы с наиболее нейтральными заменами, которые представляют собой все 12 возможных замен каждого нуклеотида в любой другой в четырежды вырожденных синонимичных сайтах.

Далее мы сравнили полученные мутационные спектры тараканов, низших термитов и высших термитов между собой (двухвыборочный t-тест, тест Уилкоксона, многофакторный дисперсионный анализ) и нашли, что частота мутаций $Ah > Gh$ митохондриального генома увеличивается с увеличением продолжительности жизни: наименьшая частота $Ah > Gh$ у тараканов, затем она увеличивается у термитов. Мутационный спектр тараканов показывает схожесть с термитным в асимметрии эквивалентных пар, частота замен $Ch > Th$ также превышает частоту замен $Gh > Ah$. Результаты могут подтвердить гипотезу, что мутагенез в митохондриях связан с возрастом.

Помимо сильной асимметрии в частоте эквивалентных замен обе группы показали направленность с точки зрения обратных замен (частота $Ch > Th$ превышает частоту замен $Th > Ch$), что ожидаемо должно привести к увеличению количества T в геноме и снижению C. При этом из-за небольшой, относительно термитов, частоты $Ah > Gh$ у тараканов должно отмечаться более высокое содержание A в нуклеотидном составе. Для проверки данной гипотезы мы проанализировали нуклеотидный состав термитов и тараканов. Как и предполагалось, у обеих групп был обнаружен избыток T и недостаток C, а также увеличение количества A у нетермитных тараканов в сравнении с термитными.

Мы сравнили метрику $GhAhSkew$ у тараканов, суб-социальных тараканов, термитов с кастой рабочих, термитов без касты рабочих. Вычисления были выполнены на основе данных по митохондриальным генам семейства Blattodea, доступных в базе данных MIDORI. Затем полученные значения были использованы для расчета

скосов из соответствующих формул ($GhAhSkew = \frac{G - A}{G + A}$). Мы выявили, что у термитов обеих групп, по сравнению

с тараканами, выше переход Ah в Gh , т. е. наблюдается повышенное количество Gh . Эти результаты показывают, что повышенная продолжительность жизни, как следствие стратегии эусоциальности, действительно увеличивает окислительный стресс мтДНК термитных тараканов, который приводит к мутациям Ah в Gh .

Мы наблюдали увеличение мутации $Ah > Gh$ у более социальных термитных тараканов по сравнению с менее социальными термитными тараканами и нетермитными тараканами. Эти группы различаются в основном по продолжительности жизни, что указывает на то, что именно с этим фактором может быть связан мутационный спектр мтДНК.

Литература

1. Arbeithuber B., Hester J., Cremona M.A. et al. Age-related accumulation of de novo mitochondrial mutations in mammalian oocytes and somatic tissues // PLOS Biology. 2020. Vol. 18.
2. Mikhailova A. G., Shamansky V., Mikhailova A. A. et al. A mitochondrial mutational signature of temperature in ectothermic and endothermic vertebrates // bioRxiv. 2020. P. 221184.
3. Tasaki E., Takata M., Matsuura K. Why and how do termite kings and queens live so long? // Phil. Trans. R. Soc. 2021. Vol. 376. P. 0740.
4. Mikhaylova A. G., Mikhailova A. A., Ushakova K. et al. A mitochondria-specific mutational signature of ageing: increased rate of A > G substitutions on a heavy chain // bioRxiv. 2022. P. 460832.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-24

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА С
В КОМПЛЕКСЕ С КАРДИОЛИПИНОМ****STUDY OF THE MECHANISM OF PEROXIDASE ACTIVITY OF CYTOCHROME C
IN COMPLEX WITH CARDIOLIPIN**И. Н. Левченко^{1,3}, Г. К. Владимиров², И. В. Володяев³¹*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*²*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*³*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*I. N. Levchenko^{1,3}, G. K. Vladimirov², I. V. Volodyaev³¹*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*²*Sechenov First Moscow State Medical University*³*Lomonosov Moscow State University*✉ irnlevchenko@yandex.ru**Аннотация**

Показано, что: 1) точки пероксидазной активности и квантовые выходы значительно выше в присутствии природного красителя кумарина С-334, чем в случае собственного неактивированного свечения или в случае природного красителя кумарина С-314; 2) пероксидазная активность зависит не только от концентрации цитохрома С в составе катализатора цитохрома С в комплексе с кардиолипином, но и от соотношения между нативной формой цитохрома С и частично денатурированной.

Abstract

It is shown that: 1) the points of peroxidase activity and quantum yields are significantly higher in the presence of the natural dye coumarin C-334 than in the case of its own non-activated glow or in the case of the natural dye coumarin C-314; 2) peroxidase activity depends not only on the concentration of cytochrome C in the composition of the cytochrome C catalyst in combination with cardiolipin, but also on the relationship between the native form of cytochrome C and partially denatured.

Образование цитохрома С в комплексе с кардиолипином и приобретение им пероксидазной активности рассмотрены разными авторами. Комплекс образует наночастицы диаметром 8–12, которые освобождаются центрифугированием, имеют стандартный размер и структуру. Цитохром С в комплексе с кардиолипином подходит под описание гетерогенного катализатора.

В данной работе на основании анализа параметров цитохрома С с кардиолипином, природного красителя кумарина С-334, природного красителя кумарина С-314, пероксидазы хрена и люминола проведены исследования сравнения сенсibiliзирующей способности люминола, природного красителя кумарина С-334 и природного красителя кумарина С-314 с целью уточнения структуры, функции, точек пероксидазной активности и квантовых выходов. Полученные результаты представляют практический интерес для изучения сенсibiliзирующей активности природных красителей флуоресцентных зондов физических активаторов кумаринов, структуры, функций пероксидазной активности комплекса как катализатора.

Результаты

При изучении пероксидазной активности, структуры и функции активированной природным красителем флуоресцентным зондом кумарином С-334 или природным красителем флуоресцентным зондом кумарином С-314 хемилюминесценции под действием цитохрома С в комплексе с кардиолипином как катализатора были детализированы результаты, полученные в экспериментах по запуску апоптоза. Учитывалось, что природные соединения имеют стандартную полосу поглощения интенсивностей с максимумом 699 нм и в кинетических экспериментах свет является распространенным источником возбуждения.

Для оценки расчетов точек пероксидазной активности выбран способ, основанный на хемилюминесценции люминола в конденсированной среде, интенсивность которой зависит от концентрации фермента. Количество точек определялась светосуммой. Величина амплитуды зависела от количества фермента в хемилюминесцентной реакции. Для нахождения констант скорости строилась калибровочная кривая зависимости ин-

тенсивности. В каждой пробе оценивали квантовый выход хемилюминесценции учитывая скорость реакции. Использовались данные проведенных пяти последовательных измерений степени разрушения кумаринов в течение 8 мин. опыты подтверждают, что в случае применения флуоресцентных зондов, физических активаторов природного красителя кумарина С-334 или природного красителя кумарина С-314 наблюдается максимальный спектр поглощения флуоресценции при максимальном значении квантового выхода, природные красители устойчивы к прямому окислению.

Кроме того, при частичной денатурации цитохрома С происходит разрыв связи Fe(heme)···S(Met80), и цитохром С приобретает пероксидазную активность. Она выражена в цитохроме С в комплексе с кардиолипином. Физический активатор хемилюминесценции флуоресцентный зонд природный краситель кумарин С-314, так же как флуоресцентный зонд природный краситель кумарин С-334, активно окисляется цитохромом С в комплексе с кардиолипином, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе цитохрома С в комплексе с кардиолипином под действием пероксида водорода

Для того чтобы сделать правильный анализ о количестве точек пероксидазной активности и квантовых выходов, нужно учесть, что: 1) пероксидазная активность зависит не только от концентрации цитохрома С, но и от соотношения, определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы; 2) механизм этого усиления хемилюминесценции — перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии на флуоресцентный уровень как у природного красителя кумарина С-314, так и природного красителя кумарина С-334.

Выводы

Цитохром С в комплексе с кардиолипином отличается от нативного цитохрома С по следующим свойствам: 1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; 2) теряет поглощение в полосе Core (405–410 нм), вследствие разрыва координационной связи железа гема с серой метионинового остатка Met80 в цитохроме С; 3) обладает пероксидазной активностью и, таким образом, катализирует образование липидных радикалов в мембране; 4) Природный краситель флуоресцентный зонд кумарин С-314 физический активатор хемилюминесценции окисляется цитохромом С в комплексе с кардиолипином, так же как природный краситель флуоресцентный зонд кумарин С-334, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе цитохрома С в комплексе с кардиолипином под действием пероксида водорода.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-25

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ БАРКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА МУТАГЕНЕЗА
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НЕМАТОД*****USING BARCODING DATA TO ANALYZE THE MUTAGENESIS
OF NEMATODE MITOCHONDRIAL DNA**

В. В. Лобанова, Б. Э. Ефименко, К. Ю. Попадьян

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

V. V. Lobanova, B. E. Efimenko, K. Yu. Popadin

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad✉ valeriavlobanova@gmail.com**Аннотация**

Тип Nematoda представляет собой перспективную группу для изучения взаимосвязи экологических и генетических характеристик, однако количество качественно секвенированных последовательностей, в том числе мтДНК, для них невелико. В данной работе была рассмотрена возможность увеличения базы данных для подобных анализов за счет использования данных баркодирования (*COXI*), обозначены возможные проблемы и их значимость для анализов мутагенеза мтДНК.

Abstract

The Nematoda phylum is a promising group for studying the relationship between ecological and genetic characteristics, but the number of high-quality sequences, including mtDNA, is small. In this work, the possibility of increasing the database for these aims by using barcoding data (*COXI*) was considered, possible problems and their significance for mtDNA mutagenesis analyses were identified.

Тип Nematoda характеризуется чрезвычайно большим разнообразием жизненных циклов, морфологии и генетики. Предварительные оценки видового разнообразия нематод сильно превосходят нынешнее количество известных видов [1]. В то же время существуют гипотезы, согласно которым различные особенности жизненного цикла и образ жизни организмов влияют на процессы мутагенеза, вызывая превалирование одних типов мутаций над другими. В литературе было показано влияние различных особенностей жизненного цикла, таких как температура или окислительный стресс на мутагенез мтДНК у рыб, млекопитающих, птиц, в раковых тканях человека и т. д. [2]. Здесь мы предполагаем, что разнообразие жизненных циклов нематод может влиять на характер мутагенеза и эволюции мтДНК у нематод. Чтобы проверить данную гипотезу, мы осуществили подготовку данных о мутагенезе мтДНК нематод для дальнейшего поиска взаимосвязи с особенностями их жизненных циклов.

Анализируя последовательности 189 доступных в базе данных RefSeq полных митохондриальных геномов типа Nematoda, мы построили филогенетическое дерево, восстановив предковые последовательности, и реконструировали мутационный спектр для монофилетических групп нематод. В соответствии с результатами эксперимента по накоплению мутаций у *Caenorhabditis elegans* [3], мы увидели два наиболее распространенных типа замещений в мтДНК доступных нематод: C > T и G > A.

При этом свободноживущие нематоды с быстрым жизненным циклом показали накопление тимина в наиболее свободных от отбора синонимичных позициях. Это согласуется с известными данными о том, что мутация цитозина в тимин является одной из самых частых мутаций в ДНК и используется как маркер скорости молекулярной эволюции, так как считается, что частота естественного возникновения этой мутации для ДНК, находящейся в одноцепочечном состоянии в процессе репликации, приблизительно одинакова в единицу времени.

Далее мы расширили видовой набор данных с помощью 1723 последовательностей митохондриального гена *COXI* базы данных MIDORI [4]. Поскольку база данных основывается на результатах BLAST-анализов, полученные последовательности частично были неполными или захватывали нуклеотиды за пределами 5'- или 3'-концов белок-кодирующих участков гена. Для возможности анализа кодонов мы провели дополнительную перекрестную проверку с аминокислотными последовательностями, также предоставленными MIDORI, и изменили последовательности в соответствии с выявленными сдвигами рамок считывания. После очистки данных 1449 последовательностей были предоставлены для дальнейшей работы.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-20143.

© В. В. Лобанова, Б. Э. Ефименко, К. Ю. Попадьян, 2023

На данный момент известно, что все белок-кодирующие гены мтДНК у класса Chromadorea расположены на одной цепи, имея явно выраженную асимметрию структуры, тогда как класс Euporlea включает виды с расположением белок-кодирующих генов как на одной, так и на обеих цепях. Учитывая особенности получения данных MIDORI при помощи алгоритмов выравнивания, нет достоверной аннотации о расположении последовательности на одной или другой цепи. Более того, само определение цепей для типа с подобной вариативностью структуры мтДНК представляется довольно затруднительным, так как, в отличие от млекопитающих с явно выраженной асимметрией репликации цепей, есть свидетельства о репликации мтДНК *Caenorhabditis elegans* по типу катящегося кольца с образованием лариатов [5].

Мы провели анализ нуклеотидного содержания в четырехжды вырожденных и третьих позициях кодонов с помощью метода главных компонент, который показал, что нет ожидаемых выраженных различий внутри класса Euporlea, которые могли бы быть связаны с аннотацией цепей мтДНК. При этом нематоды Euporlea имеют явно выраженный сдвиг по отношению к классу Chromadorea. Определяемые как филогенетически более близкие к общему предку нематод, Euporlea имеют повышенное содержание аденина и цитозина, в то время как Chromadorea более богаты тиминном и гуанином в наиболее свободных от влияния отбора позициях.

Таким образом, мы провели подготовку и первичный анализ последовательностей базы данных MIDORI, которые показали свою перспективность в изучении мутагенеза мтДНК нематод, несмотря на отсутствие данных о структуре полных митохондриальных геномов. В то же время мы получили свидетельства о накоплении под воздействием мутагенеза различных нуклеотидов у классов Chromadorea и Euporlea. В дальнейшем мы планируем проанализировать полученный результат с учетом различных классификаций по экологическим характеристикам и особенностям жизненных циклов, чтобы выявить возможные причины различий нуклеотидного состава.

Литература

1. Hodda M. Phylum Nematoda: trends in species descriptions, the documentation of diversity, systematics, and the species concept // *Zootaxa*. 2022. Vol. 5114, № 1. P. 290–317.
2. Mikhailova A. G. et al. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // *Nucleic acids research*. 2022. Vol. 50, № 18. P. 10264–10277.
3. Konrad A. et al. Mitochondrial mutation rate, spectrum and heteroplasmy in *Caenorhabditis elegans* spontaneous mutation accumulation lines of differing population size // *Molecular Biology and Evolution*. 2017. Vol. 34, № 6. P. 1319–1334.
4. Leray M., Knowlton N., Machida R. J. MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences // *Environmental DNA*. 2022. Vol. 4, № 4. P. 894–907.
5. Lewis S. C. et al. A rolling circle replication mechanism produces multimeric lariats of mitochondrial DNA in *Caenorhabditis elegans* // *PLoS genetics*. 2015. Vol. 11, № 2. P. e1004985.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-26

АННОТАЦИЯ И КЛАСТЕРИЗАЦИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НАНОТЕЛ АКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПЛАТФОРМАХ ILLUMINA И OXFORD NANOPORE

ANNOTATION AND CLUSTERIZATION OF NUCLEOTIDE SEQUENCES OF SHARK NANOBODIES PRODUCED ON THE ILLUMINA AND OXFORD NANOPORE PLATFORMS

А. В. Малеева¹, А. И. Дахновец², А. Д. Грановский², Е. В. Корнеенко¹, А. В. Кудрявцев^{1,2}

¹Институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

²Сколковский институт науки и технологий, Москва

A. V. Maleeva¹, A. I. Dakhnovets², A. D. Granovsky², E. V. Korneenko¹, A. V. Kudryavtsev^{1,2}

¹Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

²Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

✉ a.maleeva@sysbiomed.ru

Аннотация

Нанотела — это перспективная альтернатива классическим антителам. В данной работе была проведена оценка качества последовательностей, полученных на платформах Illumina и Oxford Nanopore с последующими аннотацией и кластеризацией.

Abstract

Nanobodies are a promising alternative to classical antibodies. In this work, the quality of sequences obtained on the Illumina and Oxford Nanopore platforms was assessed, followed by annotation and clustering.

Иммуноглобулины (Ig), или антитела, являются частью гуморального звена иммунитета. Они участвуют в защите организма от различных патогенов и характеризуются высоким разнообразием. Человеческие антитела имеют большой размер и состоят из двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей [1]. H- и L-цепи содержат вариабельные домены, которые стабилизируют при связывании антигена. Однако из-за большой молекулярной массы антител [1] их применение в медицине и технологиях ограничено.

Многообещающей альтернативой является применение однодоменных антител, или нанотел, которые обнаружены у верблюдов [2] и акул [3]. Структурно от классических антител они отличаются отсутствием L-цепи [2] и являются гомодимерами, состоящими из двух H-цепей [3]. Было показано, что для распознавания и связывания антигена достаточно только одного вариабельного домена H-цепи однодоменного антитела [4, 5].

Изучение и использование нанотел требует их грамотной классификации. На данный момент нанотела акул (IgNAR) делят на 4 изоформы в зависимости количества и расположения классических и неклассических цистеинов в вариабельном домене (VNAR) [6].

Главной целью работы являлась классификация нуклеотидных последовательностей, полученных на платформах Illumina и Oxford Nanopore.

Исходной матрицей являлась РНК, полученная из клеток периферической крови акул *Chiloscyllium punctatum*. Полученные библиотеки кДНК были просеквенированы либо на платформе Illumina, либо на платформе Oxford Nanopore. Полученные после секвенирования последовательности обрабатывались и проходили контроль качества. Отобранные после этого последовательности были использованы для определения каркасных последовательностей и участков CDR внутри вариабельных регионов, а также дальнейшей кластеризации. В качестве референсов использовались известные изоформы IgNAR.

Среди полученных последовательностей достоверно определялись как IgNAR 2 и неизвестный по литературным данным тип. Практически отсутствовали последовательности, идентифицируемые как IgNAR 1, так как он является специфичным для другого вида акулы. Кластеризация CDR3 показала, что большинство из них имеет длину от 40 до 59 п. о. Анализ качества полученных данных показал, данные с платформы Oxford Nanopore обладают недостаточным качеством для подобного анализа.

Полученные данные необходимы для получения более специфических праймеров для получения нанотел, а также для генноинженерных манипуляций, которые позволяют менять их характеристики.

Литература

1. Schroeder H. W. Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. Vol. 125. 2 Suppl 2. P. S41–S52.
2. Sandin S., Ofverstedt L. G., Wikstrom A. C. et al. Structure and flexibility of individual immunoglobulin G molecules in solution // *Structure.* 2004. Vol. 12. P. 409–415.
3. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains // *Nature.* 1993. Vol. 363 (6428). P. 446–448.
4. Greenberg A. S., Avila D., Hughes M. et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks // *Nature.* 1995. Vol. 374 (6518). P. 168–173.
5. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status // *J. Biotechnol.* 2001. Vol. 74 (4). P. 277–302.
6. Kovalenko O. V., Olland A., Piche-Nicholas N. et al. Atypical antigen recognition mode of a shark immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) variable domain characterized by humanization and structural analysis // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288 (24). P. 17408–17419.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-27

**СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВИРУСНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ГРУППЫ ИНДИВИДОВ
С УЧЕТОМ ИХ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ***

**STOCHASTIC MODEL OF VIRAL INFECTION OF A GROUP OF PEOPLE,
TAKING INTO ACCOUNT THEIR SOCIAL BEHAVIOR**

А. А. Панова

Московский государственный технический университет им. Н. Э. Баумана

A. A. Panova

Bauman Moscow State Technical University

✉ Panova005@gmail.com

Аннотация

Предложена модель инфицирования вирусом SARS-COV-2 в группе, среди которых есть как инфицированные, так и восприимчивые индивиды. Сочетаются микромодель, корректно учитывающая начальную стадию инфицирования, и макромоделю случайного перемещения индивидов в помещении с внутренними препятствиями. Представлены результаты моделирования динамики инфицирования в различных социальных условиях.

Abstract

A model of SARS-COV-2 infection in a group with infected and susceptible individuals is proposed. A micromodel that correctly accounts for the initial stage of infection and a macromodel of the random movement of individuals in a room with internal obstacles are combined. Results of modeling the dynamics of indoor infestation under different social conditions are presented.

Рост числа техногенных катастроф, появление новых и возрождение традиционных вирусных заболеваний, вероятность террористических атак с использованием биологически активных веществ требуют ужесточения требований безопасности и санитарно-эпидемиологических норм. При этом эффективны методы математического моделирования, сочетающие микромодели на клеточном уровне и макромоделю, имитирующие движение групп людей в различных социальных условиях.

В клеточную модель внесено два новых элемента. Во-первых, учитывается поток клеток патогена, поступающих из локальной атмосферы. Во-вторых, учитывается эффект первоначального иммунитета и критическая начальная концентрация клеток патогена. Если начальная концентрация клеток патогена в организме ниже критического значения, то в результате естественного вымирания концентрация клеток вируса будет монотонно снижаться до нуля. Если начальная концентрация клеток патогена превысит критическое значение, то произойдет взрывной рост концентрации патогена.

Вследствие хаотического перемещения членов группы концентрация вирионов в локальной атмосфере является случайным процессом. Концентрация вирионов в атмосфере моделируется как случайный логарифмически нормальный процесс, структурированный во времени.

Если детерминированный поток вирионов из локальной атмосферы меньше критического значения, то в организме индивида устанавливается постоянная концентрация клеток патогена. Ситуация кардинально меняется для флуктуирующего потока вирионов из атмосферы. В случайной атмосфере всегда наступит момент времени, когда уровень концентрации вирионов, поглощенных восприимчивым индивидом, станет выше критического значения и произойдет взрывной рост концентрации патогена в организме.

Поток вирионов в организм восприимчивого индивида может привести к последующему развитию тяжелого заболевания. Это заболевание проявится через время, порядка десяти часов после того, как индивид покинул опасную зону. Вероятность инфицирования зависит от начальной степени иммунитета, концентрации вирионов в атмосфере и времени экспозиции в зараженной атмосфере. Поэтому разработка математических моделей, имитирующих случайное поведение индивидов в различных ситуациях, является актуальной задачей.

Предлагается принципиально новая модель социального движения индивидов. Модель основана на идеях метода молекулярной динамики и теории случайных процессов. Вводится потенциал, препятствующий прямому физическому контакту индивидов друг с другом и со стенками помещения.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-29-00243.

У каждого индивида есть желаемая скорость перемещения, которая складывается из стохастической и детерминированной компонент. Хаотическая скорость движения обусловлена индивидуальными особенностями поведения. Мы моделируем это как случайный процесс с конечным временем затухания автокорреляционной функции. Это позволяет описать «память» индивида о ранее принятом решении о скорости и направлении движения. Величина и направление детерминированной компоненты скорости зависят от ситуации. Например, при панике детерминированная скорость направлена к выходу из опасной зоны.

Система стохастических обыкновенных дифференциальных уравнений динамики инфицирования и хаотического движения индивидов численно интегрируется современными алгоритмами типа Рунге — Кутты.

Представлены результаты расчетов динамики изменения относительного расстояния между членами группы, оценки случайной концентрации вирионов, поглощаемых восприимчивыми членами группы. Проведен анализ результатов при поведении группы индивидов в галерее без внутренних колонн и с колоннами в различных социальных условиях, в том числе во время паники. Показано, что при эвакуации из галереи с колоннами вероятность инфицирования восприимчивых членов группы высока по сравнению с эвакуацией без колонн. Представлен анализ вероятности инфицирования в случае наличия в галерее локальных областей, социально притягательных для индивидов или представляющих опасность для посещения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-28

СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК
РАСКРЫВАЕТ ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
NY-ESO-1-СПЕЦИФИЧНЫХ TCR Т-КЛЕТОК В МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ SK-MEL-37*

SINGLE CELL RNA SEQUENCING REVEALS TRANSCRIPTOMIC INSIGHTS
OF NY-ESO-1 SPECIFIC TCR T-CELLS IN SK-MEL-37 MELANOMA MODEL

О. Ю. Перик-Заводская¹, Р. Ю. Перик-Заводский¹, Ю. А. Шевченко¹, М. С. Фишер¹, М. О. Вольнец^{1,2},
С. Алрхмун^{1,2}, К. В. Назаров¹, А. Алсаллум^{1,2}, Ю. А. Лопатникова¹, В. В. Курилин¹, Ю. В. Жукова¹,
Ю. Г. Филиппова¹, О. И. Соловьева³, Е. Л. Завьялов³, Я. Акахори², Х. Шики², А. Н. Силков¹, С. В. Сенников^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

³Центр коллективного пользования SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

⁴Университет Мие, Цу, Япония

O. Yu. Perik-Zavodskaja¹, R. Yu. Perik-Zavodskii¹, Yu. A. Shevchenko¹, M. S. Fisher¹, M. O. Volynets^{1,2}, S. Alrhoun^{1,2},
K. V. Nazarov¹, A. Alsallum^{1,2}, Yu. A. Lopatnikova¹, V. V. Kurilin¹, Y. V. Zhukova¹, Y. G. Filippova¹, O. I. Solovyeva³,
E. L. Zavjalov³, J. Akahori⁴, H. Shiku⁴, A. N. Silkov¹, S. V. Sennikov^{1,2}

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

³Center for Collective Use SPF-vivarium ICG SB RAS, Novosibirsk

⁴Mie University, Tsu, Japan

✉ perik.zavodskaja@gmail.com

Аннотация

TCR Т-клеточная терапия является одним из наиболее перспективных подходов к лечению солидных опухолей. В данной работе мы оценили иммунный транскриптом NY-ESO-1-специфичных TCR Т-клеток методом секвенирования РНК единичных клеток до и после введения таких клеток мышам с ксенографтом меланомы Sk-Mel-37 и обнаружили выраженную цитотоксическую молекулярную сигнатуру и *in vivo* цитотоксический эффект.

Abstract

TCR T-cell therapy is one of the most promising approaches for the treatment of solid tumors. In this work, we assessed the immune transcriptome of NY-ESO-1-specific TCR T-cells by single cell RNA sequencing before and after injection of such cells into Sk-Mel-37 melanoma xenograft mice and found a pronounced cytotoxic molecular signature and an *in vivo* cytotoxic effect.

Цель исследования — определение транскрипционного профиля единичных TCR Т-клеток, специфичных к NY-ESO-1, выделенных из периферической крови мыши с ксенографтом человеческой меланомы Sk-Mel-37.

Материалы и методы

Для получения TCR Т-клеток, специфичных к NY-ESO-1, в эксперименте использовали мононуклеарные клетки периферической крови, обработанные анти-CD3 антителами для индукции пролиферации Т-клеток, из которых выделили тотальную РНК, трансдуцировали полученные Т-клетки ретровирусом, содержащим анти-NY-ESO-1 конструкцию, представленную Т-клеточным рецептором, из которых также выделили тотальную РНК. Полученные TCR Т-клетки были частично заморожены до проведения транскрипционного анализа единичных клеток, частично введены иммуносупрессированным мышам с ксенографтом человеческой клеточной линии меланомы Sk-Mel-37 внутривенно. На 28-й день, после полного исчезновения ксенографта опухоли, у экспериментальных мышей была взята периферическая кровь, из которой были выделены мононуклеарные клетки на градиенте плотности Фиколл. Мононуклеарные клетки были затем отсортированы при помощи позитивной магнитной сортировки по CD3 с целью получения Т-клеток. Также были разморожены ранее полученные Т-клетки и выделены на градиенте плотности Фиколл с целью повышения жизнеспособности.

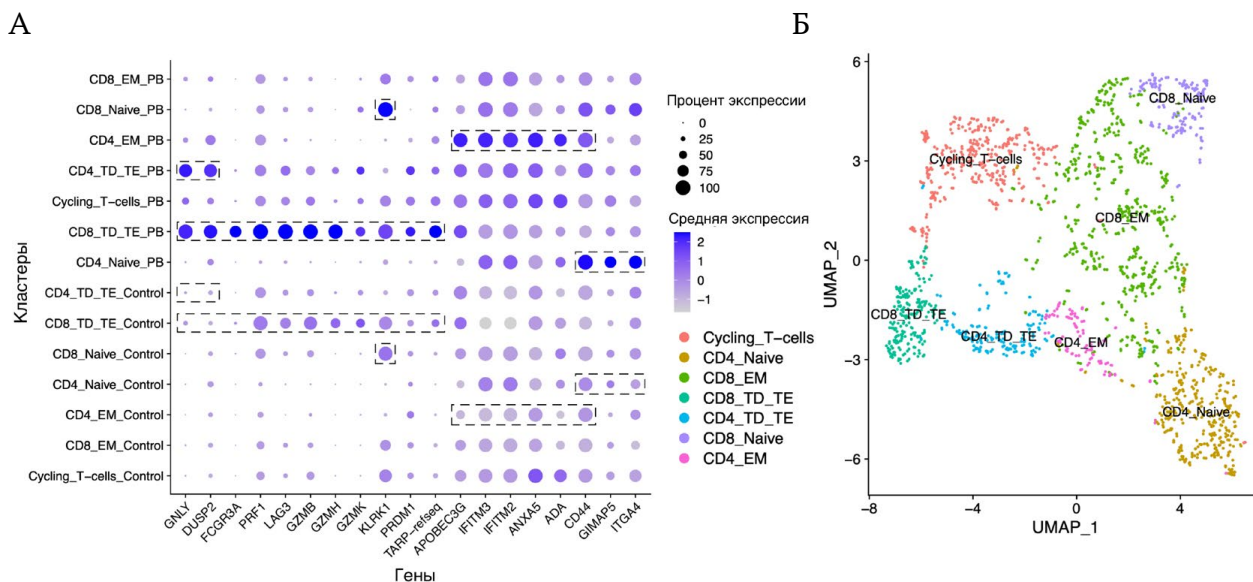
* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-65-00004.

© О. Ю. Перик-Заводская, Р. Ю. Перик-Заводский, Ю. А. Шевченко, М. С. Фишер, М. О. Вольнец, С. Алрхмун, К. В. Назаров, А. Алсаллум, Ю. А. Лопатникова, В. В. Курилин, Ю. В. Жукова, Ю. Г. Филиппова, О. И. Соловьева, Е. Л. Завьялов, Я. Акахори, Х. Шики, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2023

Полученные из периферической крови мыши и размороженные Т-клетки были помечены антителами для мультиплексирования Sample Tag и загружены в станцию для мультиомного профилирования BD Rhapsody Express. Далее к клеткам были добавлены улавливающие бусы с молекулярными штрихкодами, произведен лизис клеток и гибридизация мРНК с бусами. Затем для получения финальных библиотек иммунного транскриптома и Sample Tag была выполнена обратная транскрипция и проведено два раунда полугнездовой и один раунд гнездовой ПЦР. Полученные библиотеки пулировали и секвенировали на приборе Illumina NovaSeq 6000. Финальные матрицы экспрессии генов были получены путем обработки полученных FASTQ файлов при помощи проприетарного пайплайна BD версии 1.10.

Для анализа экспрессионной сигнатуры трансдуцированных Т-клеток было произведено исследование дифференциально-экспрессированных генов между трансдуцированными и нетрансдуцированными Т-клетками при помощи bulk-транскриптомики на ранее выделенной тотальной РНК на платформе NanoString.

Для анализа матриц экспрессии генов был использован пакет Seurat 5.0 языка программирования R. Была проведена очистка данных и контроль качества, а сами матрицы были объединены. Затем данные были нормализованы при помощи пакета SCTransform с учетом выбранных наиболее вариабельных по экспрессии генов. Проведено снижение размерности PCA, коррекция эффекта партии при помощи пакета Harmony, на скорректированных данных проведено снижение размерности UMAP. Т-клетки были подразделены на кластеры, идентифицированы по литературным данным [1] и по NanoString сигнатуре трансдуцированных Т-клеток (см. рисунок, Б), кластеры были затем демультимплексированы по данным Sample Tag на Т-клетки до введения и после введения, а затем была проведена внутрикластерная дифференциальная экспрессия генов с применением теста Уилкоксона при критериях биологической и статистической значимости $\log_2(\text{Fold Change}) > 0,847$ или $\log_2(\text{Fold Change}) < -0,847$ и $q\text{-value} < 0,001$ (см. рисунок).



Точечный график дифференциально-экспрессированных генов (А) и кластеры (Б) TCR-Т-клеток, специфичных к NY-ESO-1.

Пунктирные рамки равного размера показывают группы сравнения. Control — Т-клетки до введения экспериментальным животным, PB — Т-клетки, выделенные из периферической крови на 28-е сутки после введения экспериментальным животным, TD — трансдуцированные Т-клетки

Результаты

Мы обнаружили, что трансдуцированными Т-клетками преимущественно являются CD8 Т-эффекторнe клетки (CD8 TD TE), в меньшей степени — CD4 Т-эффекторнe клетки (CD4 TD TE), а также что после введения таких клеток экспериментальным животным на 28-е сутки полностью исчез опухолевый ксенографт. CD8 TD TE, выделенные на 28-е сутки из периферической крови мышей, имели ярко выраженную цитотоксическую сигнатуру (LAG3, GZMB, GZMH, GZMK), которая отсутствовала у нетрансдуцированных Т-клеток (см. рисунок).

Выводы

Полный лизис опухолевого ксенографта на 28-е сутки и наличие цитотоксической сигнатуры только у трансдуцированных Т-эффекторных клеток позволяют сказать о наличии терапевтического потенциала использованной анти-NY-ESO-1 TCR-конструкции.

Литература

- Gattinoni L., Speiser D., Lichterfeld M. et al. T memory stem cells in health and disease // Nature Medicine. 2017. Vol. 23. P. 18–27.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-29

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУННОГО ТРАНСКРИПТОМА ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК*

STUDY OF THE IMMUNE TRANSCRIPTOME OF HUMAN ERYTHROID CELLS BY SCRNA-SEQ

Р. Ю. Перик-Заводский¹, О. Ю. Перик-Заводская¹, Ю. А. Шевченко¹, М. О. Вольнец^{1,3},
С. Алрхмун^{1,3}, В. В. Денисова², К. В. Зайцев⁴, С. В. Сенников^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

²Клиника иммунопатологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

³Новосибирский государственный университет

⁴Сибирский федеральный научно-клинический центр ФМБА, Томск

R. Yu. Perik-Zavodskii¹, O. Yu. Perik-Zavodskaya¹, Yu. A. Shevchenko¹, M. O. Volynets^{1,3},
S. Alrhoun^{1,3}, V. V. Denisova², K. V. Zaitsev⁴, S. V. Sennikov^{1,3}

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

²Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

³Novosibirsk State University

⁴Siberian Federal Research and Clinical Center FMBA, Tomsk

✉ zavodskii.1448@gmail.com

Аннотация

Эритроидные клетки (ЭК) представляют собой предшественников эритроцитов, для которых показаны иммунорегуляторные свойства. Для детального изучения регуляторных механизмов ЭК мы провели анализ иммунного транскриптома ЭК костного мозга, фетальной печени и пуповинной крови методом секвенирования РНК единичных клеток. Мы обнаружили дифференциально-экспрессированные гены *ARG1*, *LGALS3*, *CXCL5* и *VEGFA* на разных стадиях дифференцировки и онтогенеза.

Abstract

Erythroid cells (ECs) are precursors of erythrocytes that have been shown to have immunoregulatory properties. For a detailed study of the regulatory mechanisms of ECs, we analyzed the immune transcriptome of ECs in the bone marrow, fetal liver, and cord blood using single cell RNA sequencing. We found differentially expressed genes *ARG1*, *LGALS3*, *CXCL5*, and *VEGFA* at different stages of differentiation and ontogeny.

Цель исследования — определение транскрипционного профиля единичных эритроидных клеток, клеток костного мозга, пуповинной крови и фетальной печени.

Материалы и методы

Из суспензии клеток костного мозга, пуповинной крови и гомогенизированной паренхимы фетальной печени методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll были выделены мононуклеарные клетки. Мононуклеарные клетки были отсортированы при помощи позитивной магнитной сортировки по CD235a с целью получения ЭК.

CD235a⁺ ЭК костного мозга, пуповинной крови и фетальной печени были помечены антителами с молекулярными штрихкодами для мультиплексирования Sample Tag и загружены в станцию для мультиомного профилирования BD Rhapsody Express, в которой было произведено добавление улавливающих мРНК металлических бус с молекулярными штрихкодами, лизис клеток и гибридизация мРНК лизированных клеток с металлическими бусами. Затем мРНК была обратно транскрибирована с получением кДНК. С целью получения финальных библиотек иммунного транскриптома и Sample Tag кДНК была амплифицирована в двух раундах полугнездовой и одном раунде гнездовой ПЦР. Полученные библиотеки были пулированы и секвенированы на приборе NextSeq 550 в ИЦиГ.

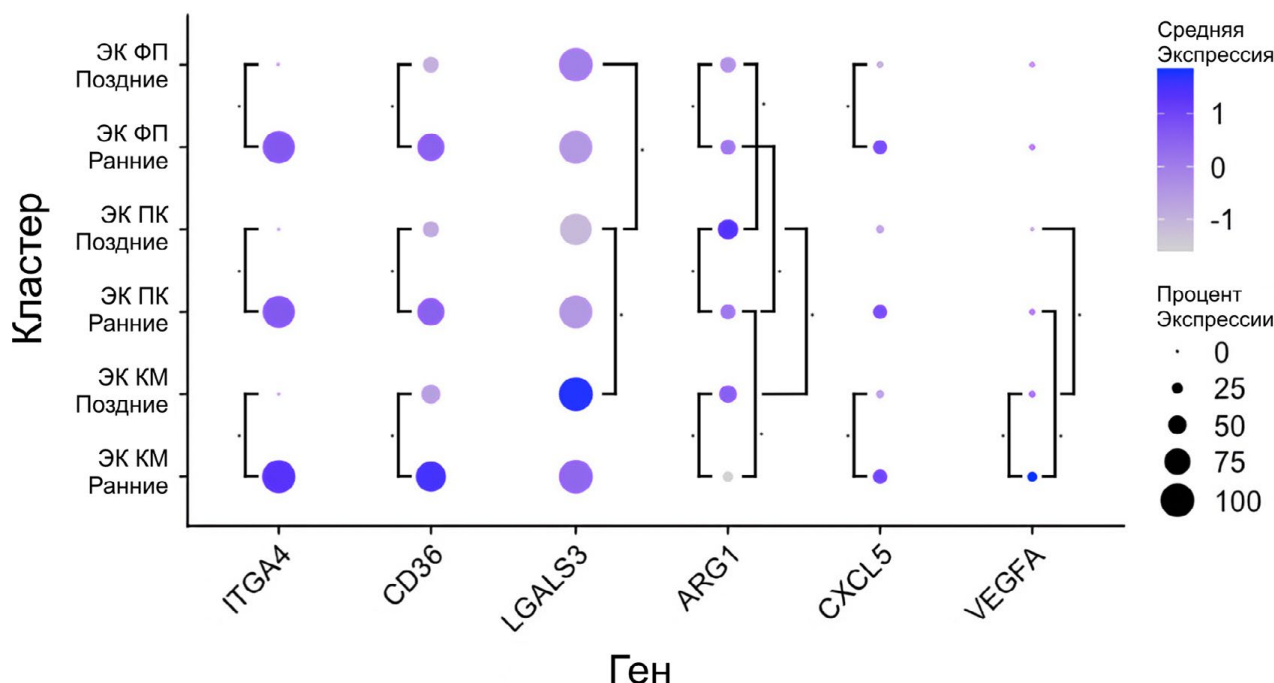
Полученные FASTQ файлы были обработаны при помощи пайплайна BD версии 1.9 с целью получения финальных матриц экспрессии генов. Матрицы экспрессии генов были проанализированы в пакете Seurat 4.0 языка программирования R. Для этого матрицы экспрессии были подвергнуты процедуре контроля качества и объединены. Затем для объединенной матрицы были найдены наиболее переменные по экспрессии гены. Объединенная

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-15-00087.

матрица была нормализована при помощи пакета SCTransform языка программирования R с учетом выбранных варибельных генов. Для нормализованной матрицы было произведено снижение размерности PCA (анализ главных компонент), произведена коррекция эффекта партии при помощи пакета Harmony языка программирования R, произведено снижение размерности UMAP на 8 скорректированных при помощи Harmony главных компонентах. Затем для эритроидных клеток были найдены кластеры, которые соответствовали ранним ЭК (ITGA4-положительные и яркие по CD36 ЭК) и поздним ЭК (ITGA4-негативные положительные и тусклые по CD36 ЭК). Кластеры ранних и поздних ЭК были затем подразделены на ЭК из костного мозга (КМ), пуповинной крови (ПК) и фетальной печени (ФП) при помощи демультимплексирования по информации Sample Tag. Затем была проведена внутрискластерная и межкластерная дифференциальная экспрессия генов при помощи теста Уилкоксона с критериями биологической и статистической значимости $\log_2(\text{Fold Change}) > 0,585$ или $\log_2(\text{Fold Change}) < -0,585$ и $q\text{-value} < 0,001$.

Результаты

В ЭК костного мозга, пуповинной крови и фетальной печени была обнаружена экспрессия иммунорегуляторных генов *ARG1*, *CXCL5*, *CXCL8*, *DEFA3*, *DEFA4*, *LGALS3*, *LGALS9* и *VEGFA*. При этом для *ARG1*, *CXCL5*, *LGALS3* и *VEGFA* наблюдалась дифференциальная экспрессия как на различных стадиях дифференцировки, так и на различных этапах онтогенеза (см. рисунок).



Точечный график дифференциально-экспрессированных генов эритроидных клеток на различных стадиях дифференцировки и на различных этапах онтогенеза. ЭК — эритроидные клетки, ФП — фетальная печень, ПК — пуповинная кровь, КМ — костный мозг. Серый цвет обозначает отсутствие экспрессии гена, глубокий синий обозначает максимальную экспрессию гена. Размер точки отражает процент клеток, экспрессирующих ген. На графике указаны биологически и статистически значимые парные сравнения

Выводы

Нами была обнаружена экспрессия таких ранее не описанных для ЭК человека иммунорегуляторных генов, как *DEFA3*, *DEFA4* и *LGALS9*. Наличие же дифференциально-экспрессированных иммуносупрессивных генов *ARG1* [1, 2] и *LGALS3* [3] на различных этапах как дифференцировки, так и онтогенеза позволяет предположить наличие нескольких субпопуляций ЭК с различным иммуносупрессивным потенциалом.

Литература

1. Delyea C., Bozorgmehr N., Koleva P. et al. CD71+ erythroid suppressor cells promote fetomaternal tolerance through arginase-2 and PDL-1 // The Journal of Immunology. 2018. Vol. 200 (12). P. 4044–4058.
2. Elahi S., Ertelt J.M., Kinder J.M., et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection // Nature. 2013. Vol. 504 (7478). P. 158–162.
3. Farhad M., Rolig A. S., Redmond W.L. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment // Oncoimmunology. 2018. Vol. 7 (6). P. e1434467.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-30

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА *

STRUCTURAL CHANGES OF BOVINE SERUM ALBUMIN IN IMPRINTING PROCESS

П. М. Соболева, Н. А. Бурмистрова

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

P. M. Soboleva, N. A. Burmistrova

Chernyshevsky Saratov State University

✉ sobpolina@yandex.ru

Аннотация

В данной работе методом молекулярной динамики проведено моделирование структуры бычьего сывороточного альбумина (БСА) на начальном этапе синтеза импринтированных белков, а также изучены структурные изменения БСА в кислой среде методами динамического светорассеяния и спектроскопии кругового дихроизма.

Abstract

In this work a molecular dynamics simulation of bovine serum albumin (BSA) was carried out at the first stage of imprinted proteins synthesis. Structural changes of BSA under acidic conditions was studied using dynamic light scattering and circular dichroism spectroscopy.

Белки имеют тенденцию к агрегации под действием различных внешних условий. Белковые агрегаты могут проявлять нежелательные эффекты, такие как снижение или полная потеря биологической активности, иммуногенность и другие побочные эффекты. На сегодняшний день агрегация белков остается одной из основных проблем при разработке биотехнологических продуктов [1]. В связи с этим актуальным является моделирование белковой структуры для понимания механизма агрегации и повышения эффективности и безопасности производимой продукции.

В этом плане интерес представляет изучение влияния кислотности среды на изменение структуры бычьего сывороточного альбумина (БСА) и процесс агрегации в контексте разработки синтетических аналогов антител — импринтированных белков [2, 3]. В рамках работы проведено моделирование структуры БСА на начальном этапе синтеза импринтированных белков методом молекулярной динамики, а также изучение структурных изменений БСА в кислой среде (рН 3,0) методами динамического светорассеяния и спектроскопии кругового дихроизма. Показана возможность использования метода молекулярной динамики для обоснования выбора белковой матрицы на этапе планирования эксперимента и оптимизации условий синтеза импринтированных белков.

Литература

1. Wang W., Nema S., Teagarden D. Protein aggregation — Pathways and influencing factors // International journal of pharmaceutics. 2010. Vol. 390 (2). 89–99.
2. Pidenko P., Zhang H., Lenain P. et al. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // Analytica Chimica Acta. 2018. Vol. 1040. P. 99–104.
3. Pidenko P., Presnyakov K., Beloglazova N., Burmistrova N. Imprinted proteins for determination of ovalbumin // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2022. Vol. 414 (18). P. 5609–5616.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-16-00102.

© П. М. Соболева, Н. А. Бурмистрова, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-31

**МЕХАНИСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИНТЕРФЕРОН-ОПОСРЕДОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ
ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ*****A MECHANISTIC MODEL OF TYPE 1 IFN-MEDIATED INFLAMMATION IN SYSTEMIC LUPUS
ERYTHEMATOSUS**Я. А. Угольников^{1,2}, А. А. Волкова²⁻⁴, В. В. Соколов²⁻⁴¹Центр математического моделирования в разработке лекарств ПМГУ им. И. М. Сеченова, Москва²Институт вычислительной математики им. Г. И. Марчука РАН, Москва³ООО «Эм энд Эс Десижанс», Москва⁴Научно-технологический университет «Сириус», СочиY. A. Ugolkov^{1,2}, A. A. Volkova²⁻⁴, V. V. Sokolov²⁻⁴¹Research Center of Model-Informed Drug Development, Sechenov First Moscow State Medical University²Marchuk Institute of Numerical Mathematics RAS, Moscow³M&S Decisions LLC, Moscow⁴Sirius University of Science and Technology, Sochi

✉ ugolkov_ya_a@staff.sechenov.ru

Аннотация

Была разработана физиологически-обоснованная математическая модель интерферон-опосредованного воспаления при системной красной волчанке, описывающая терапевтический эффект трех различных препаратов (анифролумаба, сифалимумаба и даксдилимаба), с последующим применением для объяснения изменчивости в ответе на лечение и непрямого сравнения препаратов.

Abstract

A mechanistic mathematical model of type 1 IFN-mediated inflammation in lupus was developed to capture and explain heterogeneity in the treatment-mediated response of the three different therapies (anifrolumab, sifalimumab and daxdilimab) in systemic lupus erythematosus.

Системная красная волчанка (СКВ) — это хроническое аутоиммунное заболевание, поражающее различные органы и ткани, включая кожу, суставы, почки, сердце и легкие. Патогенез красной системной волчанки связан с множеством факторов, таких как генетическая предрасположенность, влияние окружающей среды и нарушения в работе различных компонент иммунного ответа, понимание которых необходимо для разработки новых, более эффективных методов лечения данного заболевания. Воспаление, опосредованное повышенным уровнем интерферона 1-го типа (ИФН1), является одним из ключевых факторов прогрессии заболевания. ИФН1-сигнальный путь является мишенью сразу для нескольких таргетных терапий, блокирующих его на разных уровнях: анифролумаб (связывает рецептор ИФН1), сифалимумаб (связывает ИФН-альфа) и даксдилимаб (уменьшает количество плазматитоидных дендритных клеток (ПДК) — основного источника ИФН1).

Целью данной работы было проведение непрямого сравнения эффективности описанных препаратов в СКВ для различных подгрупп пациентов при помощи физиологически-обоснованной математической модели.

В рамках исследования была построена механистическая математическая модель, описывающая основные процессы ИФН1-опосредованного воспаления. ПДК синтезируют ИФН1, связывание которого с рецептором активирует экспрессию ИФН-стимулированных генов, с последующей модуляцией иммунного ответа в виде набора положительно-обратных связей. Система состоит из 17 нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений с 52 параметрами, 29 из которых были зафиксированы на физиологических значениях из опубликованных источников. Оценка неизвестных значений параметров модели осуществлялась с использованием индивидуальных временных рядов фармакокинетики и фармакодинамики анифролумаба и усредненных данных даксдилимаба. Модель успешно описывает независимые (не используемые в процедуре оценки параметров) наборы данных клинических исследований всех трех препаратов. Согласно результатам глобального анализа чувствительности,

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-71-10051.

© Я. А. Угольников, А. А. Волкова, В. В. Соколов, 2023

уровень ИФН-альфа, ИНФ1-рецепторов, а также соотношение подтипов ИФН1 перед началом лечения имеют наибольшее влияние на подавление ИФН1-опосредованного воспаления под действием рассматриваемых терапий. При этом анализ нормированной зависимости «концентрация — ответ» показал больший фармакодинамический эффект анифролумаба по сравнению с другими препаратами.

Таким образом, разработанная механистическая модель отражает основные аспекты ИФН1-опосредованного воспаления и описывает данные трех терапий с различным механизмом действия. Полученные на базе модели прогнозы позволяют оптимизировать эффективность лечения СКВ с учетом индивидуальных показателей пациентов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-32

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ
АЛЬТЕРНАТИВНЫХ САЙТОВ НАЧАЛА ТРАНСКРИПЦИИ*****IDENTIFICATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF ALTERNATIVE TRANSCRIPTION START SITES**

А. П. Филатова, С. С. Пинтус

Научно-технологический университет «Сириус», Сочи

A. P. Filatova, S. S. Pintus

Sirius University of Science and Technology, Sochi

✉ anastasiyafilatova01@yandex.ru

Аннотация

Исследование и определение альтернативных стартовых сайтов инициации транскрипции необходимо для фундаментального понимания процессов регуляции работы генов. В данной работе был проведен поиск и анализ альтернативных пиков TSS в тканях печени и мышечной ткани ног у групп медленно- и быстрорастущих кур. Сравнение двух различных типов тканей у кур с различной скоростью роста позволяет лучше понять разнообразие TSS и их связь с фенотипическими особенностями.

Abstract

Determination of alternative transcription start sites is necessary for understanding of gene regulation processes. In this study, a search and analysis of alternative TSS peaks were conducted in liver and leg muscle tissues of slow- and fast-growing groups of chickens. Comparing two different types of tissues in chickens with varying growth rates allows for a better understanding of the diversity of TSS and their association with the phenotype.

Активация альтернативных TSS (transcription start site) является способом регуляции экспрессии генов. Разнообразие транскриптов, обусловленное альтернативными TSS, может быть оценено при помощи кэп-анализа экспрессии генов (CAGE). Установлено, что у различных организмов наблюдается активация альтернативных TSS для регуляции тканеспецифичной экспрессии генов [1].

В текущем исследовании был применен подход поиска альтернативных пиков TSS (TSS, объединенные в кластеры) по данным CAGE-seq тканей курицы (*Gallus gallus*) в зависимости от расстояния до известных транскриптов, аннотированных Ensembl (GRCg6a). Количественное распределение расстояний до известных транскриптов CAGE-seq данных, полученных консорциумом FANTOM, формирует отчетливый пик около нулевых значений (рис. 1). Следовательно, подход CAGE-seq может быть применен для детекции как уже известных TSS, так и альтернативных вариантов TSS.

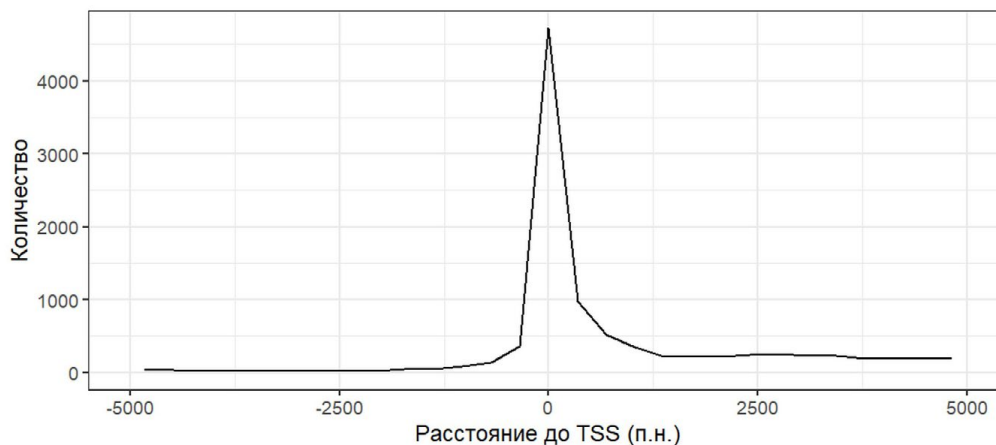


Рис. 1. Распределение расстояний до аннотированных TSS согласно Ensembl

* Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2021-601.
© А. П. Филатова, С. С. Пинтус, 2023

Далее был получен пул пиков TSS тканей быстро- или медленно растущих куриц — гибридов II поколения, и проанализированы ткани печени и мышц ног. Все пики были разделены на группы альтернативных и нулевых пиков. Пики с расстоянием в интервале $(-10; 10)$ считались нулевыми, все остальные — альтернативными. Значения экспрессии пиков были определены как среднее значение экспрессии пика (TPM) по всем образцам для групп медленно- и быстро растущих куриц отдельно. Также был проведен анализ дифференциальной экспрессии пиков с помощью пакета DESeq2 и анализ обогащения наборов генов с помощью базы данных PANTHER Slim GO.

Распределение пиков ближе к диагонали графика (рис. 2, 3) свидетельствует о том, что группы быстро- и медленно растущих куриц не характеризуются специфичными наборами активных пиков TSS. Данное явление наблюдается как в ткани печени, так и в мышцах ног.

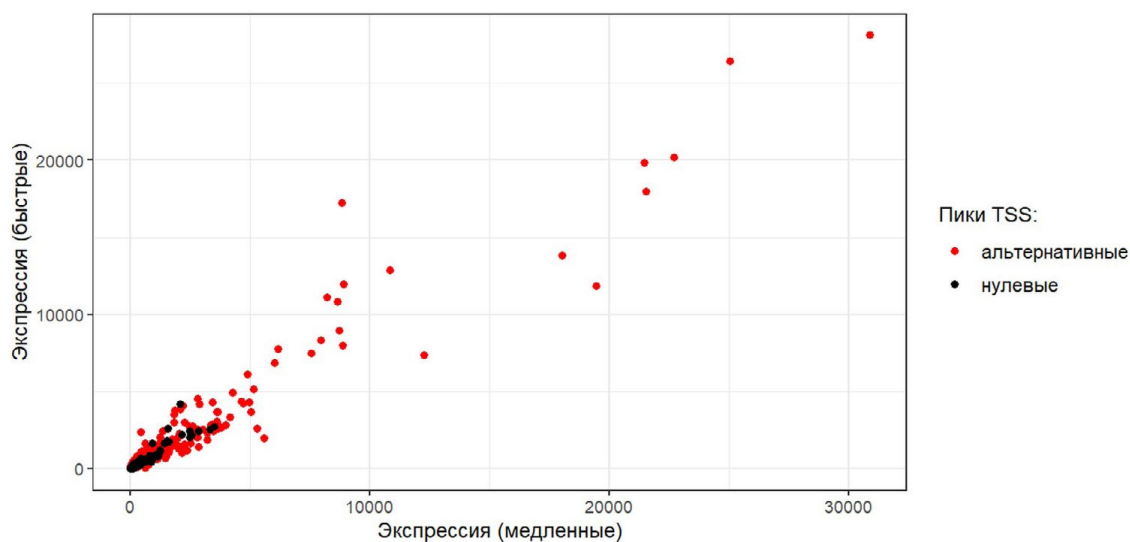


Рис. 2. Распределение пиков TSS в группах медленно- и быстро растущих куриц в мышечной ткани ног

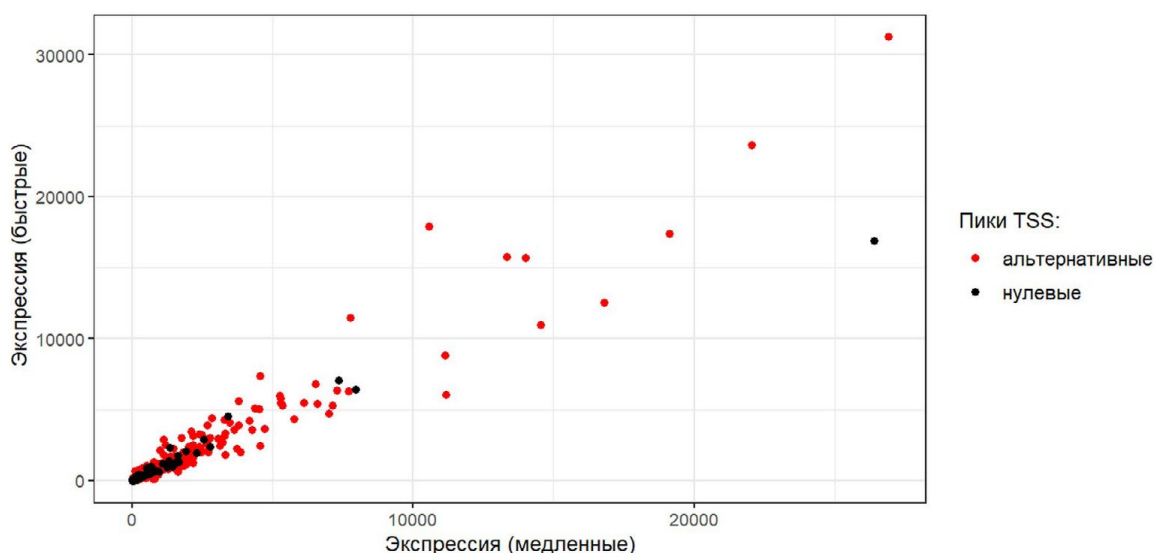


Рис. 3. Распределение пиков TSS в группах медленно- и быстро растущих куриц в ткани печени

Отдельно были рассмотрены и проаннотированы к генам высокоэкспрессирующиеся пики (более 4000 TPM) в группах медленно- и быстро растущих куриц, выбивающиеся из общего распределения пиков (см. рис. 1, 2). Анализ обогащения наборов генов показал, что эти пики соотносились с генами, контролирующими основные функции соответствующей ткани (см. таблицу).

Среди этой группы высокоэкспрессирующихся пики в ткани мышц ног дифференциально экспрессирующимися оказались 3 TSS из 28, соотнесенные к генам: *TMEM167B*, *RPS26*, *TPT1*. В ткани печени — 11 TSS из 36, соотнесенные к генам: *TF*, *DHRS7*, *FGB*, *ALB*, *UFC1*, *APOH*, *AvBD9*, *TMEM167B*, *APOC3*, *RPS26*, *MT4*.

Результаты анализа обогащения высокоэкспрессированных пиков

Печень		
Биологический процесс	Fold Enrichment	P-value (FDR)
Регулирование всасывания липидов в кишечнике (GO:1904729)	> 100	1.35e-02
Регулирование всасывания в кишечнике (GO:1904478)	> 100	1.25e-02
Регулирование всасывания холестерина в кишечнике (GO:0030300)	> 100	1.18e-02
Отток фосфолипидов (GO:0033700)	> 100	1.87e-02
Свертывание крови (GO:0072378)	> 100	2.97e-02
Обратный транспорт холестерина (GO:0043691)	> 100	2.86e-02
Каскад активации белков (GO:0072376)	> 100	3.54e-02
Процесс биосинтеза 5-фосфорибозы-1-дифосфата (GO:0006015)	> 100	3.42e-02
Мышечная ткань ног		
Сокращение мышц (GO:0006936)	40,18	4.85e-02
Работа мышечной системы (GO:0003012)	39,42	3.82e-02
Развитие мышечной структуры (GO:0061061)	35,42	4.15e-02
Организация актинового цитоскелета (GO:0030036)	12,57	9.79e-02
Процессы с участием актиновых филаментов (GO:0030029)	12,22	5.59e-02

Из всего пула пиков была исключена группа данных высокоэкспрессирующихся пиков для получения распределения дифференциально экспрессирующихся альтернативных и нулевых пиков (рис. 4, 5).

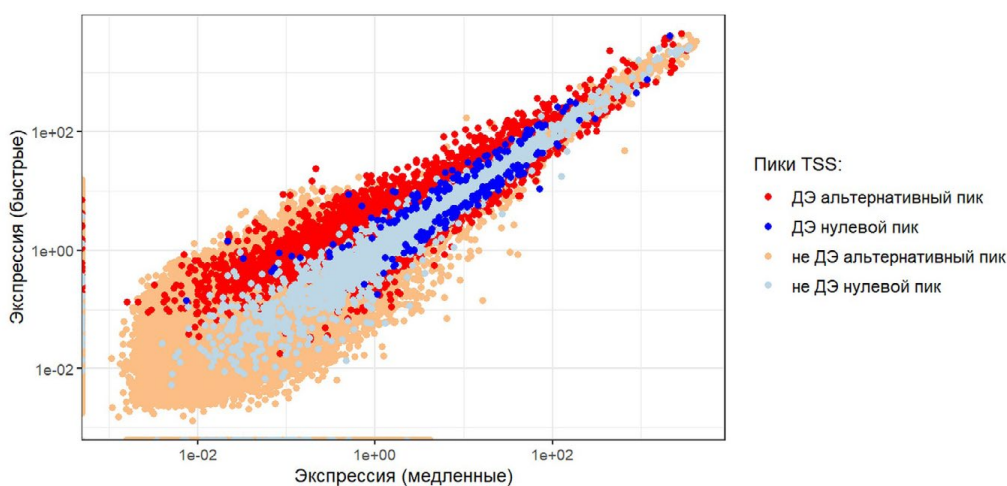


Рис. 4. Распределение дифференциально и недифференциально экспрессирующихся пиков мышечной ткани ног (логарифмический масштаб)

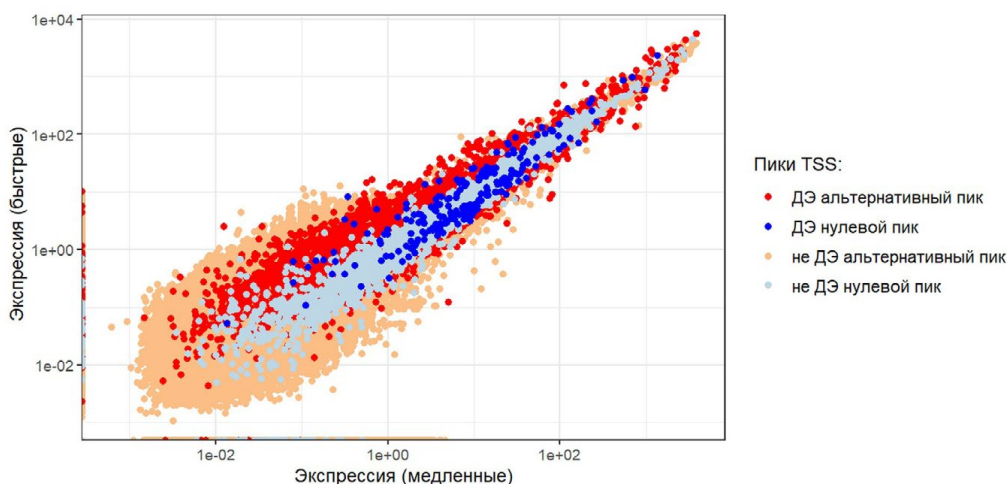


Рис. 5. Распределение дифференциально и недифференциально экспрессирующихся пиков ткани печени (логарифмический масштаб)

В мышечной ткани среди сверхэкспрессированных пиков в группе быстрорастущих куриц, согласно анализу обогащения генов, были обнаружены пути, отвечающие за клеточный ответ на трансформирующий фактор роста бета.

При проведении исследования была сформулирована гипотеза о том, что специализация ткани обеспечивается не многими, а лишь определенными генами с высоким уровнем экспрессии. Было замечено, что при заданных условиях большая часть пиков характеризуется как альтернативные, что может быть связано с неточностью аннотации, а также строгими критериями отбора нулевых пиков. Полученные результаты будут учтены при дальнейшем анализе образцов других типов тканей.

Литература

1. Dahale S. et al. Cap analysis of gene expression reveals alternative promoter usage in a rat model of hypertension // Life Science Alliance. 2022. Vol. 5 (4).
2. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome biology. 2014. Vol. 15. P. 1–21.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-33

НЕЙРОСЕТЕВОЙ ПОДХОД К АППРОКСИМАЦИИ ЛОКАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ КОАЛЕСЦЕНТНЫХ ВРЕМЕН*

NEURAL NETWORK APPROACH TO APPROXIMATION OF LOCAL COALESCENTE TIME

Е. В. Хомутов, К. Арзыматов, В. Л. Щур

Национальный исследовательский университет «Высшая Школа Экономики», Москва

E. V. Khomutov, K Arzymatov, V. L. Schur

National Research University Higher School of Economics, Moscow

✉ ehomutov@hse.ru

Аннотация

Геномные данные содержат информацию о демографии. Время до последнего общего предка (LCA) в локусах может отличаться. Оценка LCA используется для выявления изменений численности популяции. В данной работе предложен новый метод с применением глубокого обучения для определения LCA, показывающий точность и возможность его адаптации для сложных сценариев.

Abstract

Genomic data contains information about demographic events. The time to the last common ancestor (LCA) in loci may differ. The LCA score is used to identify changes in population size. Here we propose a new method using deep learning to determine LCA showing the accuracy and possibility of its adaptation for complex scenarios.

Геномные данные представляют собой обширный источник информации о популяционной истории, особенно для видов с активной рекомбинацией. Время до последнего общего предка (LCA) между двумя хромосомами может меняться для различных хромосомных локусов. Оценка локального времени LCA имеет большую значимость для разных задач, таких как выявление генов, подверженных отбору, и определение изменений в эффективной численности популяции. Существующий метод PSMC [1], основанный на скрытых марковских моделях, применяется для вычисления локального времени LCA и эффективного размера популяции.

В данной работе предлагается новый подход, основанный на глубоком обучении, для определения локального времени LCA на геномном уровне. Полученные результаты показывают, что наш метод точно определяет LCA на локальном уровне, а также обеспечивает точное распределение локального времени. Это, в свою очередь, позволяет корректно рассчитать траекторию эффективного размера популяции. В перспективе данный подход может быть адаптирован для более сложных демографических моделей.

В работе также представлен переход от локального времени коалесценции в каждом локусе к глобальному времени распределения для более точного сравнения с методом PSMC.

Литература

1. Li H., Durbin R. Inference of human population history from individual whole-genome sequences // Nature. 2011. Vol. 475. P. 493–496.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-71-00143.
© Е. В. Хомутов, К. Арзыматов, В. Л. Щур, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-34

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОКИНГА ПРИ СОЗДАНИИ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗЫ MAPK14 — ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ МИШЕНИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

DOCKING FOR DESIGN OF A MAPK14 INHIBITOR — A THERAPEUTIC TARGET IN ALZHEIMER'S DISEASE

И. Ю. Хохлова, В. В. Какоткин, М. А. Агапов, Е. В. Семина, Е. Г. Чупахин

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

I. Yu. Khokhlova, V. V. Kakotkin, M. A. Agapov, E. V. Semina, E. G. Chupakhin

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

✉ xoxlova.iu26@yandex.ru

Аннотация

Болезнь Альцгеймера характеризуется чрезмерным количеством противовоспалительных цитокинов, продуцируемых посредством активации протеинкиназы MAPK14. С помощью докинга были отобраны 20 соединений-кандидатов, 12 из которых показали эффективность в отношении связывания с глицином 110 в структуре фермента. Связывание в указанном фрагменте характерно для высокоспецифичной глицин-флип стратегии разработки ингибитора протеинкиназы-MAPK14.

Abstract

Alzheimer's disease is characterized by an excessive amount of anti-inflammatory cytokines produced through the activation of the protein kinase MAPK14. Twenty candidate compounds were selected by docking, 12 of which showed efficacy in binding to glycine 110 in the enzyme structure. Binding at this fragment is characteristic of a highly specific glycine flip strategy for the development of inhibitor protein kinase MAPK14.

Нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера, характеризуются чрезмерной активацией микроглии, вызывающей нейровоспаление. В этом процессе принимают участие системные медиаторы воспаления: интерлейкин-1-β, интерлейкин-6, фактор некроза опухолей α и оксид азота [1].

В зависимости от фактора, вызывающего воспаление, задействованы различные пути внутриклеточной сигнализации, вовлекающие конкретные протеинкиназы. Киназы, в зависимости от субстрата фосфорилирования, представляют собой потенциально значимые терапевтические мишени для борьбы с многочисленными заболеваниями и патологическими состояниями.

Разработка ингибиторов протеинкиназ традиционными методами молекулярной биологии осложняется за счет больших экономических, временных и материальных ресурсов. В связи с этим целесообразно начальные стадии разработки лекарств проводить *in silico* с использованием фармакофорного подхода, методов хемоинформатики и молекулярного моделирования (докинга).

MAPK14 имеет четыре изоформы, наиболее изученная — изоформа p38α, которая в основном и отвечает за биосинтез провоспалительных цитокинов.

При разработке ингибитора протеинкиназ, участвующих в подавлении болезни Альцгеймера, помимо селективности по отношению к другим нецелевым киназам, основным препятствием было достижение селективности p38α по сравнению с другими изоформами.

Наиболее селективная стратегия разработки ингибитора — глицин-флип стратегия, задействующая глицин 110 в структуре фермента. Когда подходящий акцептор водородной связи (например, карбонил) ингибитора приближается к глицину 110, амидная связь глицина поворачивается, чтобы зацепить водородную связь с карбонилем ингибитора. Такой переворот связи вдоль возможен только для небольшой аминокислоты, такой как глицин. Следовательно, это обуславливает высокую селективность ингибитора относительно других киназ.

Целью данного исследования было использование метода докинга для проверки библиотеки, содержащей 900 уникальных соединений, синтезированных в БФУ им. И. Канта за последние 5 лет, на специфичность связывания с протеинкиназой MAPK14.

Для проверки была выбрана методика докинга Glide v. 6.7 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015) [3], которая использует серию иерархических фильтров для поиска возможных местоположений лиганда в области

активного сайта рецептора, обеспечивая максимально близкий к исчерпывающему поиск по положению, ориентации и конформационному пространству, доступному лиганду.

В отличие от других методов стыковки лигандов с жесткой трехмерной структурой известного белкового рецептора, методика Glide осуществляет более гибкий систематический поиск конформационного, ориентационного и позиционного пространства фермента, связанного с лигандом. Кристаллическая структура протеинкиназы МАРК14 в комплексе с лигандом была взята из Protein Data Bank (PDB ID:1OZ1).

Для оптимизации кристаллической структуры фермента выполняли встроенную процедуру подготовки белка с применением параметров по умолчанию, которые включали в себя: добавление атомов водорода, нулевой порядок связей, удаление молекул связанной воды (на расстоянии свыше 5 ангстрем), создание дисульфидных связей.

Процедура подготовки лигандов необходима для оптимизации структур молекул и включает в себя нейтрализацию заряженных групп, создание таутомеров и удаление нежелательных и неверных структур молекулы. Докинг проводили с использованием стандартных настроек — коэффициент масштабирования радиуса Ван-дер-Ваальсовых сил 0,8, инверсия пирамидальных атомов азота и конформация ароматических колец по умолчанию.

Встроенная функция Ligand Interaction Diagram позволяет посмотреть приблизительное расположение лиганда к ферменту, с возможным формированием связей между ферментом и функциональными группами ингибитора.

Из 900 соединений потенциальных ингибиторов были отобраны 20 молекул-кандидатов, специфичных к МАРК14 с показателем связывания выше заданного значения 8,0.

Наиболее эффективные лиганды связывания к ферменту показали соединения 1,3-тиазола, пиразола, барбитуровой кислоты, индола, имеющие заместители-акцепторы водорода при гетероциклическом фрагменте, что делает их подходящими для связывания с глицином-110 в структуре фермента.

Из 20 выбранных методом докинга соединений 12 могут быть активными в отношении глицин-флип стратегии разработки ингибитора МАРК14, а значит селективными и высокоспецифичными.

Дальнейшая эффективность соединений будет проверена методами молекулярной биологии — вестерн-блот и фенотипический скрининг.

Литература

1. Figuera-Losada M., Rojas C., Slusher B. S. Inhibition of microglia activation as a phenotypic assay in early drug discovery // J. Biomol. Screen. 2014. Vol. 19 (1). P. 17–31.
2. Chackalamannil S., Rotella D., Ward S.E. Comprehensive Medicinal Chemistry // Elsevier Ltd. 2017. Vol. 7. P 409–423.
3. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47. P. 1739–1749.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-35

РЕАКЦИОННО-ДИФфуЗИОННАЯ МОДЕЛЬ ИНФАРКТА МИОКАРДА***REACTION-DIFFUSION MODEL OF MYOCARDIAL INFARCTION**

Ч. А. Цгоев

*Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Новосибирск
Новосибирский государственный университет*

Ch.A. Tsgoev

*Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ chermen@tsgoyti.ru

Аннотация

С применением минимальной математической модели динамики асептического воспаления выполнен цикл численных исследований процесса некротической гибели клеток и воспалительного ответа при ишемическом инфаркте миокарда. Основное внимание сосредоточено на анализе закономерностей пространственно-временного развития процесса. Выполнены оценки эффективности ряда гипотетических терапевтических стратегий. Результаты моделирования согласуются с экспериментальными данными.

Abstract

A series of numerical studies of the necrotic cell death process and inflammatory response in ischemic myocardial infarction has been performed using a minimal mathematical model of aseptic inflammation dynamics. The main attention is focused on the analysis of regularities of spatial and temporal development of the process. Evaluations of the efficacy of a number of hypothetical therapeutic strategies have been performed. The modeling results are in agreement with experimental data.

Цепочка событий, приводящих к тяжелым повреждениям сердечной мышцы при ишемических инфарктах миокарда, установлена в клинических исследованиях и воспроизводится в лабораторных условиях. Даже кратковременные сбои в системе коронарного кровоснабжения приводят к истощению запасов кислорода в кардиомиоцитах (основных клетках миокарда, выполняющих сократительную функцию). Вследствие этого возникает локализованный очаг необратимого некротического повреждения миокарда, внутри которого и в его окрестности разворачивается, с одной стороны, каскад патологических процессов, связанных с накоплением токсических продуктов обмена, а с другой — восстановительная ответная реакция организма на повреждение, центральным звеном которой является активация иммунного ответа в виде асептического воспаления. Наиболее важными факторами и биомаркерами воспаления считаются клетки иммунной системы, в первую очередь — лейкоциты (моноциты-макрофаги и др.), а также медиаторы воспаления — цитокины (среди них интерлейкины IL-1, IL-10, хемокин фактор некроза опухолей TNF- α).

Для описания этого процесса в рамках единой биологической и математической идеализации биохимических процессов предложены локальная и пространственно-неоднородная математические модели, исследованы некоторые свойства решений этих задач и даны их биологические интерпретации, основанные на сопоставлении с экспериментальными данными [1, 2]. При калибровке моделей в качестве эталонного процесса рассматривался острый инфаркт в левом желудочке сердца мыши. Конечно-разностный алгоритм численного решения задач основан на методе типа предиктор-корректор второго порядка с A-устойчивым методом Адамса в качестве корректора, классической неявной схеме расщепления по пространственным направлениям и идее метода Зейделя. Алгоритм обеспечивает численное решение задач с порядком точности, весьма близким к теоретическому.

В рамках принятых моделей проанализирован характер пространственно-временного распространения веществ (клеточных популяций и медиаторов воспаления) и формирование нелинейных динамических структур в используемой реакционно-диффузионной системе уравнений при отсутствии конвективных слагаемых. Исследован типичный сценарий развития воспаления в крупном очаге повреждения, характеризующийся благоприят-

* Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального исследовательского центра информационных и вычислительных технологий.

ным исходом инфаркта [2]. Проанализированы базовые механизмы воспалительной реакции, выполнена оценка роли основных медиаторов воспаления.

Изучен механизм поляризации макрофагов и его роль в «типичном» сценарии развития крупноочагового инфаркта с относительно благоприятным исходом. Вычислительный эксперимент, базирующийся на известных экспериментальных данных о развитии инфаркта в левом желудочке сердца мыши, сфокусирован на двух взаимосвязанных направлениях — на общей проблеме изучения закономерностей функционирования механизма поляризации макрофагов и на анализе терапевтического потенциала гипотетических стратегий управления макрофагами. Показано, что M1/M2 поляризация макрофагов представляет собой аддитивный эффект функционирования, как минимум, двух механизмов: цитокин-зависимого механизма активации и перепрограммирования активированных макрофагов. Первый из них является решающим для инициации и формирования воспалительного ответа, обеспечивающего очищение зоны повреждения от продуктов распада, а второй во многом определяет дальнейший сценарий развития инфаркта, сдерживая избыточную воспалительную реакцию при инфаркте.

Проанализированы возможные варианты управления поляризацией макрофагов с одной, двумя и четырьмя мишенями и определен континуум наиболее успешных терапевтических стратегий. Показано, что терапия, составной частью которой является управление перепрограммированием активных макрофагов, является орган-сберегающей, при этом терапевтический эффект обеспечивается за счет благоприятного динамического соотношения пулов про- и противовоспалительных макрофагов во время острой фазы воспаления. Наибольшую эффективность продемонстрировала комбинированная стратегия, сочетающая в себе одновременно управление цитокин-зависимой активацией макрофагов и их перепрограммированием.

Результаты моделирования демонстрируют вариативность возможных терапевтических воздействий на макрофаги, что создает основу для выработки эффективной стратегии управления поляризацией макрофагов в лабораторных условиях, в том числе и для адаптации оптимального выбора в «терапевтическом окне» к индивидуальным условиям течения инфаркта. Результаты моделирования качественно и количественно согласуются с экспериментальными данными.

Литература

1. Voropaeva O. F., Tsgoev S. A., Shokin Y. I. Numerical simulation of the inflammatory phase of myocardial infarction // Journal of Applied Mechanics and Technical Physics. 2021. Vol. 62, iss. 3. P. 441–450.
2. Ворopaева О. Ф., Цгоев Ч. А. Численное моделирование инфаркта миокарда. I. Анализ пространственно-временных аспектов развития местной воспалительной реакции // Математическая биология и биоинформатика. 2023. Т. 18, № 1. С. 49–71.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-36

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ТКАНЯХ МОЗГА МЫШЕЙ
С МФТП-ИНДУЦИРОВАННЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРОГРАММНОГО ПАКЕТА DESEQ2**

**DIFFERENTIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN BRAIN TISSUES OF MICE
WITH MPTP-INDUCED PARKINSONISM USING THE DESEQ2 SOFTWARE PACKAGE**

А. Б. Чумакова, М. М. Руденок, Е. К. Семенова, С. А. Партевян, И. Н. Рыболовлев, М. И. Шадрина, И. Н. Власов

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

A. B. Chumakova, M. M. Rudenok, E. K. Semenova, S. A. Partevyan, I. N. Rybolovlev, M. I. Shadrina, I. N. Vlasov

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow

✉ elisif46n@mail.ru

Аннотация

Данная работа посвящена разработке программного конвейера на языке программирования R для дифференциального анализа экспрессии генов с использованием программного пакета DESeq2. Исследование проводилось с целью выявления генов, дифференциально экспрессируемых в процессе развития нейродегенеративных процессов в тканях мозга мышей с МФТП-индуцированной болезнью Паркинсона.

Abstract

This work is devoted to the development of a software pipeline for differential analysis of gene expression using the DESeq2 software package in the R programming language. The research was conducted in order to identify differentially expressed genes during the development of neurodegenerative processes in the brain tissues of mice with MPTP-induced Parkinson's disease.

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное хроническое заболевание. В настоящее время существует большое количество данных о значимости вклада генетических факторов в патогенез БП. Помимо изменений структуры ДНК, таких как мутации и рисковые полиморфизмы, важную роль в патогенезе БП также могут играть и изменения, происходящие на других клеточных уровнях, в том числе на уровне изменения экспрессии генов [1].

Работа посвящена разработке программного конвейера на языке программирования R для дифференциального анализа экспрессии генов с использованием программного пакета DESeq2. Цель данного исследования заключалась в выявлении генов, дифференциально экспрессируемых в процессе развития нейродегенеративных процессов, путем проведения полнотранскриптомного анализа тканей черной субстанции мозга мышей с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП)-индуцированной хронической моделью БП с использованием разработанного программного конвейера.

Были выявлены дифференциально экспрессированные гены, ассоциированные с различными биологическими процессами, такими как процессы клеточного роста, механизмы поддержания локализации белка, процессы метаболизма активных форм кислорода, воспалительные процессы. Полученные результаты анализа обогащения могут указывать на сложные механизмы комплексного ответа на прогрессирование БП.

Все полученные статистически значимые гены показали пониженную экспрессию у мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом. Из генов, соответствующих терминам, наиболее релевантным к БП, особый интерес для дальнейшего исследования влияния на патогенез болезни могут представлять следующие: *Sgk1*, *Cdkn1a*, *Nrros*, *Cntf*. Понижение экспрессии генов (*Sgk1*, *Nrros*, *Cntf*), связанных с регуляцией процессов воспаления, клеточного роста, метаболизма активных форм кислорода в клетке, может быть вовлечено в нарушение соответствующих механизмов и усиление процессов нейродегенерации при БП. Для гена *Cdkn1a*, белок которого принимает участие в процессах торможения регенерации нейронов и нейрогенеза при повреждениях мозга, снижение экспрессии может говорить об участии в компенсаторных механизмах в ответ на нейродегенерацию при БП.

Литература

1. Borraigeiro G. et al. A review of genome-wide transcriptomics studies in Parkinson's disease // Eur. J. Neurosci. 2018. Vol. 47, № 1. P. 1–16.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-37

**НА ПУТИ К КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТЫ СТАРЕНИЯ:
ОЦЕНКА ХРУПКОСТИ КАК ФАКТОРА РИСКА ОБРАЗОВАНИЯ ДЕЛЕЦИИ МТДНК*****TOWARDS QUANTIFICATION OF THE MITOCHONDRIAL COMPONENT OF AGING:
FRAGILITY SCORE AS A RISK FACTOR OF MTDNA DELETION FORMATION**В. Шаманский¹, Е. О. Третьяков², А. Г. Михайлова^{1,5}, Н. Ри¹, И. Мазунин², К. Гунбин^{1,5}, К. Попадьин^{1,6,7}¹Центр геномных исследований, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград²Отделение молекулярной неврологии, Центр исследований мозга, Венский медицинский университет, Австрия³Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва⁴Центр молекулярной и клеточной биологии Сколковского института науки и технологий, Москва⁵Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск⁶Швейцарский институт биоинформатики⁷Федеральная политехническая школа Лозанны, ШвейцарияV. Shamanskiy¹, E. O. Tretiakov², A. G. Mikhaylova^{1,5}, N. Ree¹, I. Mazunin⁴, K. Gunbin^{1,5}, K. Popadin^{1,6,7}¹Center for Mitochondrial Functional Genomics, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad²Department of Molecular Neurosciences, Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Austria³Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow⁴Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow⁵Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk⁶Swiss Institute of Bioinformatics⁷Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland

✉ v.a.shamanskiy@gmail.com

Аннотация

Старение зачастую связано с клональной экспансией соматических делеций в митохондриальной ДНК (мтДНК), хотя их происхождение до сих пор малоизвестно. Делеции часто окружены прямыми нуклеотидными повторами, однако одни только повторы не дают исчерпывающего объяснения распределения делеций. В данной работе предпринята попытка расшифровать дополнительные факторы, влияющие на образование делеций мтДНК, и создать метрику для оценки риска образования делеций.

Abstract

Ageing is often associated with clonal expansion of somatic mitochondrial (mtDNA) deletions, while their origin is still poorly known. Deletions are often flanked by direct nucleotide repeats, however, repeats solely do not provide an exhaustive explanation of deletion distribution. Here, we aim to decipher additional factors affecting formation of mtDNA deletions and create score for estimation risk of deletion formation.

Во-первых, было предположено, что повторы имеют более высокие шансы реализоваться в делеции в случае их пространственной близости [1]. Анализируя распределение делеций у человека, мы обнаружили горячую точку (6–9 т. п. н. и 13–16 т. п. н.), которая не объясняется прямыми повторами и может быть вызвана тесными контактами этих двух участков во время репликации мтДНК. Используя несколько подходов, мы реконструировали вторичную структуру большой дуги и предположили, что она организована как крупномасштабная шпилькообразная петля с центром, близким к 11 т. п. н., и стержнем между 6–9 т. п. н. и 13–16 т. п. н. В нашей окончательной модели мы продемонстрировали, что повторы внутри зоны контакта в 3 раза более мутагенные, чем повторы вне зоны контакта, что проясняет также хорошо известную повышенную мутагенность общего повтора (8470–8482 п. н. и 13447–13459 п. н.). Предложенная топологическая модель улучшает наше понимание механизмов образования делеций в митохондриальном геноме человека и открывает возможность прогнозирования делеционной нагрузки в различных гаплогруппах человека.

Во-вторых, мы проанализировали вложенное распределение инвертированных (I) и прямых (D) нуклеотидных повторов и обнаружили, что комбинации DIID являются наиболее хрупкими областями мтДНК человека.

* Работа выполнена при поддержке грантов РФФ № 21-75-20143, № 21-75-20145 и № 21-75-10081.

© В. Шаманский, Е. О. Третьяков, А. Г. Михайлова, Н. Ри, И. Мазунин, К. Гунбин, К. Попадьин, 2023

Эти результаты лучше всего совместимы с механизмом проскальзывания репликации [2, 3], где вложенный паттерн прямых и инвертированных повторов приводит к образованию делеций.

В-третьих, проводя аналогию с недавним открытием в ядерном геноме, мы предположили, что локальные структуры ДНК, отличные от В, такие как G-квадруплексы, могут способствовать образованию делеций в мтДНК. Мы аннотировали все G-квадруплексы в мтДНК человека и включили их в множественную логистическую модель, описывающую вероятность делеций. Мы заметили, что помимо контактной зоны и комбинаций D11D наличие G-квадруплексов дополнительно увеличивает образование делеций.

Наша модель соответствует механизму проскальзывания репликации, когда снижение скорости или пауза вилки репликации могут привести к делециям. Если это так, мы предполагаем, что вторичная структура (глобальная вторичная структура, локальные комбинации D11D, G-квадруплексы) может влиять на скорость репликации мтДНК. Принимая во внимание недавно описанную замену $Ah > Gh$ [4], мы предположили, что эта мутация, как ожидается, будет более распространена в этих хрупких областях мтДНК. Картируя G-квадруплексы на глобальном митохондриальном дереве, построенном на основе 50000 полных митохондриальных геномов человека, мы оценили паттерны замены SNP в этих регионах. Как и ожидалось, мы наблюдали разные паттерны мутационного спектра, которые косвенно подтверждают пониженную скорость вилки репликации в этих регионах.

Как мы видим, митохондриальный геном имеет специфическую структуру и состав нуклеотидов, которые могут влиять на образование делеций. Мы хотим выяснить, как митохондриальная анатомия человека предрасполагает к делециям. В целом мы предлагаем многофакторную модель, которая объясняет распределение соматических делеций в мтДНК человека и может быть использована для прогнозирования соматических делеций мтДНК в разных гаплогруппах человека.

Участки митохондриальной ДНК имеют различный риск образования делеций, и для каждого участка можно получить показатель оценки вероятности образования делеции на основе данных секвенирования. Нуклеотидные мотивы, такие как повторы, могут быть связаны с более высоким риском делеций в митохондриальном геноме. Мы собираемся изучить различные особенности глобальной и локальной структуры митохондриальных геномов (прямые и инвертированные повторы, энергии Гиббса, G-квадруплексы, микрогомологии, редкие делеции), в первую очередь у человека.

Находя уязвимые места в различных гаплогруппах человека, мы сможем создать универсальную метрику для оценки хрупкости участков митохондриального генома.

Литература

1. Shamanskiy V. et al. Secondary structure of the human mitochondrial genome affects formation of deletions // *BMC Biol.* 2023. Vol. 21, № 103. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01606-1>.
2. Persson Ö. et al. Copy-Choice Recombination during Mitochondrial L-Strand Synthesis Causes DNA Deletions // *Nature Communications* 2019. Vol. 10 (1). P. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08673-5>.
3. Albertini A.M. et al. On the Formation of Spontaneous Deletions: The Importance of Short Sequence Homologies in the Generation of Large Deletions // *Cell.* 1982. Vol. 29 (2). P. 319–328. DOI: [10.1016/0092-8674\(82\)90148-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90148-9).
4. Mikhailova A. G. et al. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50 (18). P. 10264–10277. DOI: [10.1093/nar/gkac779](https://doi.org/10.1093/nar/gkac779).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-38

**РАЗРАБОТКА ФОРМАЛИЗОВАННОГО НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТА
В ОТДЕЛЕНИИ НЕЙРОХИРУРГИИ МЕДИЦИНСКОГО КОМПЛЕКСА ДВФУ**

**DEVELOPMENT OF THE FORMALIZED NEUROLOGICAL STATUS OF A PATIENT
IN THE NEUROSURGERY DEPARTMENT OF THE FEFU MEDICAL COMPLEX**

Б. О. Щеглов¹, С. Н. Щеглова², А. Р. Биктимиров¹

¹*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*

²*Северо-Восточный государственный университет, Магадан*

B. O. Shcheglov¹, S. N. Shcheglova², A. R. Biktimirov¹

¹*The Far Eastern Federal University, Vladivostok*

²*North-Eastern State University, Magadan*

✉ b.shcheglov@mail.ru

Аннотация

В данной работе приводится опыт разработки и применения формализованного протокола оценки неврологического статуса пациента в Медицинском комплексе ДВФУ для оценки нервно-психической функции пациента, что позволяет уточнить диагноз и спланировать лечение. Данный протокол включает в себя клинические шкалы, оценку двигательных, сенсорных и психических показателей пациента в динамике.

Abstract

This paper presents the experience of developing and applying a formalized protocol for assessing the patient's neurological status in the FEFU Medical Complex to assess the patient's neuropsychic function, which allows clarifying the diagnosis and planning treatment. This protocol includes clinical scales, assessment of the patient's motor, sensory and mental parameters in dynamics.

Введение

Объективная оценка неврологического статуса пациента имеет решающее значение для диагностики и эффективного лечения неврологических дисфункций [1]. Традиционно эта оценка основывалась на субъективных наблюдениях и качественных описаниях, что может привести к несоответствиям в оценке статуса и трудностям в отслеживании прогресса пациента [1, 2]. Для решения этих задач в Медицинском комплексе ДВФУ был разработан и внедрен формализованный протокол оценки неврологического статуса [3]. Данный протокол использует структурированный подход, включающий клинические шкалы и комплексные оценки двигательных, сенсорных и психических параметров с течением времени. Принимая эту формализованную оценку, клиницисты могут получать объективные данные, отслеживать изменения, выявлять неврологический дефицит или улучшения и принимать обоснованные решения относительно медицинских вмешательств.

Цель работы — привести результаты опыта разработки и внедрения формализованного неврологического статуса пациента в Медицинском комплексе ДВФУ.

Методы

Формализованный протокол оценки неврологического статуса разработан с использованием структуры JSON, обеспечивающей совместимость с различными медицинскими информационными системами. Протокол включает в себя клинические шкалы, такие как визуальная аналоговая шкала боли пациента, PainDetect, Sage, а также оценки больничной тревоги и депрессии и т. д. Кроме того, он включает оценку двигательных, сенсорных и психических параметров в динамическом контексте. Эти параметры оцениваются через регулярные промежутки времени, что позволяет выявить изменения и тенденции в неврологической функции пациента. Протокол был интегрирован в медицинскую информационную систему «1С Больница», что позволило беспрепятственно интегрировать его в поликлинику и стационар.

Результаты

Формализованный протокол оценки неврологического статуса успешно внедрен и используется в Медицинском комплексе ДВФУ. Следуя протоколу, медицинские специалисты получают доступ к стандартизированным оценкам, что повышает объективность и надежность собранных данных. Применение структурированных клинических шкал позволяет интегративно измерять уровни боли, неврологических симптомов и психологического дистресса. Более того, оценка моторных, сенсорных и психических параметров дает всестороннее представление об общей нейropsychической функции пациента. Данный подход, основанный на данных историй болезней пациентов, оказался полезным для отслеживания изменений параметров нервной системы пациента, выявления неврологического дефицита или улучшения и определения соответствующих вмешательств.

Заключение

Разработка и применение формализованного протокола оценки неврологического статуса в Медицинском комплексе ДВФУ предоставил врачам-специалистам структурированный подход к оценке нервно-психической функции пациента. Включая стандартизированные клинические шкалы и оценки двигательных, сенсорных и психических параметров, протокол повышает объективность и надежность неврологических оценок. Его интеграция в медицинскую информационную систему облегчает внедрение и использование. Формализованная оценка неврологического статуса позволяет объективно отслеживать изменение показателей пациента, выявлять недостатки проведения лечения и принимать обоснованные решения для соответствующих вмешательств. В дальнейшем будут проведены исследования, посвященные применению данного протокола в оценке показателей пациентов с различными нозологиями нервно-психической системы.

Литература

1. Clark A., Das J. M., Weisbrod L. J., Mesfin, F. B. Trauma Neurological Exam. StatPearls Publishing, 2022.
2. Щеглов Б. О. Опыт применения методов иерархизации в составлении конструктора объективного статуса пациентов на примере реализации в медицинском центре ДВФУ // Медицина будущего: сб. материалов, Владивосток, 24–27 мая 2022 г. Владивосток: Дальневост. фед. ун-т, 2022. С. 257–260.
3. Щеглов Б. О. Опыт применения формализованных электронных медицинских документов в вопросах ведения пациентов нейрохирургического отделения Медицинского центра ДВФУ // Медицина будущего: сб. материалов, Владивосток, 24–27 апреля 2023 г. Владивосток: Дальневост. фед. ун-т, 2023. С. 265–268.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-39

АПРОБАЦИЯ ОБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПАП-ТЕСТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ГРАФИЧЕСКОГО ОБРАБОТЧИКА И БАЗЫ ЗНАНИЙ

APPROBATION OF OBJECTIVE METHODS FOR ASSESSING CELLULAR CHANGES IN THE PAP TEST USING A GRAPHIC PROCESSOR AND A KNOWLEDGE BASE

Б. О. Щеглов¹, С. Н. Щеглова², Г. В. Рева¹

¹*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*

²*Северо-Восточный государственный университет, Магадан*

B. O. Shcheglov¹, S. N. Shcheglova², G. V. Reva¹

¹*The Far Eastern Federal University, Vladivostok*

²*North-Eastern State University, Magadan*

✉ b.shcheglov@mail.ru

Аннотация

В данной работе рассмотрены первичные результаты апробации объективных компьютеризированных методов оценки клеточных изменений, полученных в ходе проведения теста Папаниколау в Центре лабораторной диагностики ДВФУ. Программа анализирует морфометрические данные на изображении и вносит их в базу знаний, которая на основе определенных параметров выводит гипотезу о классе клетки по системе Bethesda.

Abstract

This paper discusses the primary results of testing objective computerized methods for assessing cellular changes obtained during the Papanicolaou test at the FEFU Laboratory Diagnostic Center. The program analyzes the morphometric data on the image and enters them into the knowledge base, which, based on certain parameters, derives a hypothesis about the cell class according to the Bethesda system.

Введение

Пап-тест, также известный как тест по Папаниколау, является широко используемым методом скрининга рака шейки матки [1]. Традиционно интерпретация результатов теста Папаниколау основывалась на субъективных визуальных оценках врачей-цитологов. Однако данный подход может быть подвержен изменчивости между наблюдателями и субъективности оцениваемых параметров клеточных конгломератов по системе классификации Bethesda [2]. Особенно остро стоит проблема классификации клеток по типу ASC-US (клетки неопределенного значения), которые не имеют объективной связи с риском развития рака шейки матки [1]. Соответственно в настоящее время существует потребность в объективных методах анализа, которые могут обеспечить точную и воспроизводимую оценку клеточных изменений в мазке по Папаниколау.

Цель работы — демонстрация применения объективных методов оценки клеточных изменений Пап-теста с помощью графического обработчика и базы знаний.

Методы

В качестве материала, на котором производится оценка разработанного решения, используются данные Центра лабораторной диагностики Медицинского комплекса ДВФУ [3]. Приложение использует комбинированный алгоритм Отсу и Кэнни для извлечения маски из оцифрованных изображений клеток со стекол теста по Папаниколау для получения морфометрических показателей. Алгоритм Оцу используется для автоматического определения порога сегментации изображения, а алгоритм Кэнни применяется для обнаружения краев и контуров клеток. Полученные данные заносятся в базу знаний с детерминированными формализованными гипотезами, характеризующими классификацию клеток по системе Bethesda.

Результаты

На данный момент разработана база знаний с объективными морфометрическими атрибутами, характеризующими принадлежность клеток к классу по системе Bethesda. Точность определения эссенциальных пока-

зателей клеточных изменений с применением разработанного обработчика графической информации составила 73 % в определении ядер и 85 % в определении самой клетки на изображении. Оценка точности производилась с участием эксперта как отношение правильно определенных элементов изображений программой и их классификации ко всем обработанным результатам.

Заключение

В данной работе представлен подход к объективной оценке клеточных изменений в мазке Папаниколау с использованием графического процессора и базы знаний. Разработанное приложение предназначено для обеспечения объективной оценки основных морфометрических данных для классификации клеток по системе Bethesda. На данный момент проводится обучение сверточной нейронной сети на основе формируемого датасета для улучшения алгоритма фильтрации и повышения точности классификации клеток. Предлагаемый метод обладает значительным потенциалом для повышения объективности и надежности теста Папаниколау, тем самым улучшая скрининг и способствуя более раннему выявлению рака шейки матки.

Литература

1. Щеглов Б. О. и др. Применение цифровых технологий при обучении студентов цитологии на примере гинекологических снимков // На перекрестке Севера и Востока (методологии и практики регионального развития): материалы IV Междунар. науч.-практ. конф., Магадан, 17-18 ноября 2022 г. Красноярск: ООО «Научно-инновационный центр», 2023. С. 552-558. DOI: 10.12731/978-5-907608-10-8-art85.
2. Щеглов Б. О. Повышение объективности и достоверности результатов морфологических изменений клеток Пап-теста с помощью информационных технологий // Медицина будущего: сб. материалов, Владивосток, 24-27 апреля 2023 г. Владивосток: Дальневост. фед. ун-т, 2023. С. 43-45.
3. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023620481. Российская Федерация. Определение типов клеток по морфологическим характеристикам для цитологической диагностики рака шейки матки: № 2023620190: заявл. 01.02.2023; опубл. 06.02.2023 / Б. О. Щеглов, Г. В. Рева, С. Н. Щеглова; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет».

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-40

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ ГЕНЫ, ПРОГНОЗИРУЮЩИЕ ОТВЕТ
НА ТЕРАПИЮ ТАМОКСИФЕНОМ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***

**DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES PREDICTING RESPONSE TO TAMOXIFEN THERAPY
IN BREAST CANCER PATIENTS**

С. А. Щербакова, П. Е. Карицкая, А. С. Чеснокова, И. О. Карпец, И. В. Евгенов, Д. В. Цейликман

Новосибирский государственный университет

S. A. Shcherbakova, P. E. Karitskaya, A. S. Chesnokova, I. O. Karpets, I. V. Evgenov, D. V. Tseylikman

Novosibirsk State University

✉ s.shcherbakova@g.nsu.ru

Аннотация

Исследование направлено на поиск генов, опосредующих ответ на терапию тамоксифеном. Мета-анализ статей и построение генных сетей позволили выявить 7 генов, оказывающих значительное влияние на показатели выживаемости. С целью валидации был выбран подход анализа дифференциальной экспрессии генов. Результаты валидации выявили высокую встречаемость искомым генов. Паттерн отклонения их экспрессии от референсных значений сочетался с тем, что был указан у других авторов.

Abstract

The study is aimed at finding genes mediating the response to tamoxifen therapy. Meta-analysis of the articles and the construction of gene networks revealed 7 genes that make a significant contribution to survival rates. For the purpose of validation, the approach of analysis of differential gene expression was chosen. The validation results revealed a high occurrence of the desired genes. The pattern of deviation of their expression from the reference values was combined with that indicated by other authors.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — гетерогенное заболевание, как с точки зрения клиники, так и с точки зрения генетической основы. Врачи и исследователи решают задачу увеличения сроков 5- и 10-летней выживаемости, применяя персонализированный подход к лечению. Такой метод представляется возможным с поиском прогностических генов, опосредующих ответ пациента на терапию.

Цели исследования — поиск генов, ассоциированных с выживаемостью у пациентов РМЖ, прошедших курс терапии тамоксифеном, и валидация отобранного пула с помощью анализа дифференциальной экспрессии у резистентных к терапии пациентов.

Материалы и методы

Для анализа дифференциальной экспрессии между контрольными и обработанными тамоксифеном образцами были рассмотрены следующие наборы данных транскриптомных прочтений из National Center for Biotechnology Information (NCBI): PRJNA738710 (содержит 9 гистологических образцов, взятых у пациентов резистентных к терапии тамоксифеном) и PRJEB47439 (содержит 8 образцов клеточных линий). Для анализа использовались данные SRA. Для проверки и визуализации качества прочтений транскриптов использовалась программа FastQC. Для удаления адаптеров Illumina и улучшения качества прочтений применялся многопоточный инструмент Trimmomatic. Для парных и одиночных прочтений использовались ILLUMINACLIP и SLIDINGWINDOW. Для определения количества транскриптов по данным РНК-секвенирования использовалась программа Kallisto. В качестве референсного генома использовалась кДНК человека версии GRCh38.

Данные подсчета количества прочтений по каждому кейсу были проанализированы с помощью встроенных библиотек R: Bioconductor tximport, Bioconductor DESeq2. Проведены тесты самосогласованности для проверки целесообразности данных экспериментов с помощью анализа главных компонент. Группировку образцов визуализировали при помощи тепловой карты с использованием матрицы расстояний между исследуемыми образцами.

* Исследование поддержано грантом от Фонда содействия инновациям по программе «Студенческий стартап». Протокол заседания дирекции ФСИ № 6 от 06.07.2022 г.

Отобранная выборка по нормировочным коэффициентам визуализирована с помощью графика, отображающего зависимость $-\log_{10}(\text{p-value})$ и $\log_2\text{FoldChange}$.

Последним этапом анализа дифференциальной экспрессии является анализ обогащения биологических групп в метаболических и сигнальных путях, группах генов, локализации белков и др. Информация бралась из ресурса Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) и сравнивалась с полученным списком дифференциально экспрессированных генов.

Результаты

Был произведен отбор генов, клинически значимых для назначения терапии РМЖ. Для отбора проводился поиск генов-кандидатов с помощью информационных ресурсов, а также статьи М. Lacroix с соавт. [1]. По результатам поиска были отобраны 7 генов, которые достоверно меняют экспрессию при проведении терапии тамоксифеном у пациентов с РМЖ.

Высокая экспрессия опосредует чувствительность к терапии тамоксифеном для следующих генов: *NR3C1* (в ESR+ РМЖ), *ERRFI1* (в ESR+ РМЖ), *CAVI*. Высокая экспрессия опосредует резистентность к терапии тамоксифеном для следующих генов: *NR3C1* (в ESR– РМЖ), *MTA1*, *MED1*, *ESR2*, *NCOA1*.

Авторы библиотеки указали, что пациенты были резистентны к терапии тамоксифеном. Результаты анализа дифференциальной экспрессии: *NCOA1* и *MED1* показали наибольшую встречаемость перед остальными генами (в 10 наборах данных из 11). У 8 пациентов *NCOA1* понижал свою экспрессию, в то время как ожидаемое повышение наблюдалось только у 2 пациентов. *MED1*, напротив, показал неоднозначный профиль изменения экспрессии: только в половине образцов она ожидаемо повышалась. Обратная картина наблюдалась у *MTA1*, который повышал свою экспрессию в 77 % наборов данных, что соответствовало прогнозу на основе литературных данных. Кроме того, упомянутые гены показали высокую встречаемость в образцах. Ожидаемое изменение экспрессии продемонстрировал и мало встречающийся ген *ERRFI1*, понизив ее во всех образцах. Гены *NR3C1* и *ESR2* прогнозируемо повышали экспрессию в 66–75 % анализируемых наборов данных. Единственный ген, который непрогнозируемо повышал экспрессию в 78 % наборов данных — *CAVI*.

Выводы

Был отобран пул генов, достоверно изменяющих экспрессию при проведении терапии тамоксифеном у пациентов с РМЖ, проведена валидация отобранного набора посредством применения биоинформатических методов. Результаты анализа показали высокую встречаемость отобранного пула генов, данные по изменению экспрессии коррелировали с выводами мета-анализов и обзорных статей.

Литература

1. Lacroix M. et al. A low-density DNA microarray for analysis of markers in breast cancer // The International journal of biological markers. 2002. Vol. 17, № 1. P. 5–23.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-41

ПРИМЕНЕНИЕ ПОДХОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКОВ
РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ
О СОСТАВЕ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА

MACHINE LEARNING APPROACHES FOR METABOLIC DISEASE RISK ASSESSMENT
USING GUT MICROBIOME DATA

А. Е. Щербакова^{1,2}, Н. И. Широкий^{1,2}, Е. С. Чухрова^{1,2}, С. А. Цветикова^{1,2}, Е. И. Кошель²

¹АО «Новабиаом», Санкт-Петербург

²Университет ИТМО, Санкт-Петербург

A. E. Shcherbakova^{1,2}, N. I. Shirokii^{1,2}, E. S. Chukhrova^{1,2}, S. A. Tsvetikova^{1,2}, E. I. Koshel²

¹Novabiom, JSC, Saint Petersburg

²ITMO University, Saint Petersburg

✉ tsvetikova@novabiom.ru

Аннотация

Исследование направлено на разработку новых подходов оценки состава микробиома кишечника для диагностики заболеваний. В работе представлены алгоритмы машинного обучения для классификации ожирения, диабета II типа и синдрома раздраженного кишечника на основе данных о составе микробиома кишечника и результаты корреляционного анализа бактериального сообщества кишечника с рассмотренными заболеваниями.

Abstract

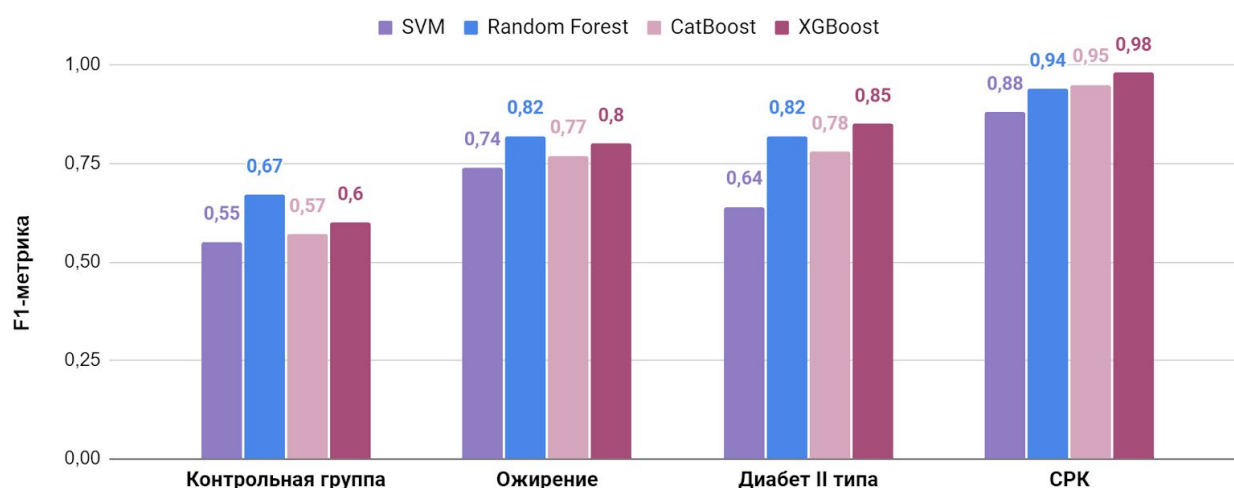
The aim of the study is to develop new method for analyzing the gut microbiome in disease diagnostics. The research presents the findings of the developed machine learning algorithms for the classification of obesity, type II diabetes, and irritable bowel syndrome based on the intestinal microbiome composition, and the results of a correlation analysis of the human intestinal bacterial community with the considered diseases.

Микробиота кишечника человека участвует во всех основных физиологических процессах, включая поддержание иммунной системы, метаболизм липидов и углеводов, а также синтез витаминов и нейромедиаторов [1–3]. Нарушения в составе микробиоты могут приводить к развитию метаболических, аутоиммунных и неврологических заболеваний. В связи с этим анализ и коррекция микробиоты в настоящее время рассматривается как перспективный метод диагностики и лечения заболеваний [4, 5]. Сегодня для решения этих задач активно используются методы машинного обучения, позволяющие анализировать большие объемы данных и выявлять корреляции между составом микробиоты и развитием заболеваний [6].

Целью исследования является разработка многоклассовой модели машинного обучения на основе данных микробиома кишечника для выявления заболеваний, наиболее часто связанных с дисбиозом микробиоты кишечника: ожирения, диабета II типа, синдрома раздраженного кишечника. В ходе исследования были проанализированы и использованы для обучения алгоритмов исходные данные 16S-секвенирования более 4000 пациентов из Европы, Азии, Южной и Северной Америки. Выбор наиболее эффективной модели для классификации заболеваний основывался на общей точности, F1-индексе, значениях ROC-кривой и сбалансированности моделей между различными классами.

Рассмотренные модели: SVM, CatBoost, Random Forest и XGBoost — показали общую точность 0,74; 0,80; 0,83 и 0,84 соответственно. Хотя XGBoost показал наибольшее значение, классификатор на основе Random Forest более сбалансирован между классами, чем XGBoost, и поэтому был выбран в качестве эффективного алгоритма.

Кроме того, было показано, что таксономические группы бактерий *Patescibacteria*, *Pseudomonadales*, *Prevotellaceae* UCG-001, *Lachnospiraceae* UCG-008, *Coprococcus* и *Collinsella* значимо коррелируют с изучаемыми заболеваниями и могут быть использованы в качестве возможных предикторов для их диагностики, а данный подход на основе машинного обучения может быть использован для анализа микробиоты кишечника при диагностике ожирения, диабета II типа и синдрома раздраженного кишечника.



Сравнительная характеристика моделей машинного обучения по F1-метрикам

Литература

1. Cho I., Blaser M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease // Nature Reviews Genetics. 2012. Vol. 13, № 4. P. 260–270.
2. Miyauchi E., Shimokawa C., Steimle A. et al. The impact of the gut microbiome on extra-intestinal autoimmune diseases // Nature Reviews Immunology. 2022. Vol. 23, № 1. P. 9–23.
3. Nikolova V.D., Hall M.N., Hall L.J. et al. Perturbations in Gut Microbiota Composition in Psychiatric Disorders // JAMA Psychiatry. 2021. Vol. 78, № 12. P. 1343.
4. Maifeld A., Bartolomaeus H., Löber U. et al. Fasting alters the gut microbiome reducing blood pressure and body weight in metabolic syndrome patients // Nat Communications. 2021. № 12. P. e1970.
5. Birkeland E., Gharagozian S., Birkeland K.I. et al. Prebiotic effect of inulin-type fructans on faecal microbiota and short-chain fatty acids in type 2 diabetes: a randomised controlled trial // European journal of nutrition. 2020. № 59 (7). P. e3325–e3338.
6. Li P., Luo H., Ji B., Nielsen J. Machine learning for data integration in human gut microbiome // Microbial Cell Factories. 2022. Vol. 21, № 1.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-42

СОЗДАНИЕ АЛГОРИТМА АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА***CREATION OF AN IMAGE ANALYSIS ALGORITHM FOR METABOLIC IMAGING**И. Д. Щечкин^{1,2}, С. А. Родимова¹, Н. В. Бобров¹, А. М. Можеров¹, Д. С. Кузнецова^{1,2}¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород²Нижегородский государственный университет им. Н.И. ЛобачевскогоI. D. Shchekhin^{1,2}, S. A. Rodimova¹, N. V. Bobrov¹, A. M. Mozherov¹, D. S. Kuznetsova^{1,2}¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ Iiahaha1992@gmail.com

Аннотация

В данном исследовании с использованием нейронных сетей был разработан алгоритм для определения характеристик флуоресценции ткани печени по изображениям FLIM. Алгоритм был обучен на наборе FLIM-изображений модели регенерации печени и смог точно определить границы клеток, выделить их на FLIM-изображении и рассчитать соответствующие параметры флуоресценции.

Abstract

The study developed an algorithm using neural networks to determine liver tissue fluorescence characteristics from FLIM images. The algorithm was trained on a set of FLIM images of a liver regeneration model and was able to accurately determine cell boundaries, isolate them in a FLIM image, and calculate corresponding fluorescence parameters.

Введение

Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия FLIM — это метод исследования, основанный на анализе времен жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров, в частности, никотинамидадениндинуклеотида (НАД(Ф)Н). Для описания затухания флуоресценции НАД(Ф)Н используются двухэкспоненциальная или трехэкспоненциальная модели, где параметры t_1 , t_2 и t_3 соответствуют временам жизни свободной, связанной и фосфорилированной форм НАД(Ф)Н соответственно, а их вклады описываются относительными амплитудами a_1 , a_2 и a_3 . Кривая затухания флуоресценции НАД(Ф)Н может служить индикатором метаболических трансформаций: рост a_1 коррелирует с усилением анаэробного гликолиза, рост a_2 может быть связан с усилением окислительного фосфорилирования, а изменение a_3 соответствует изменению синтетической функции ткани. FLIM широко применяется для изучения метаболизма биологических тканей. Современные методы компьютерного анализа способны извлекать больше данных из FLIM-изображений по сравнению с традиционными вариантами и представляют собой применение нейронных сетей (НС) к анализу изображений с целью объективизации результатов и выявления новых метрик анализа структурно-функционального состояния тканей.

Цель работы — разработка алгоритма на основе НС, способного определять характеристики флуоресценции ткани печени по FLIM изображениям.

Материалы и методы

Для набора FLIM изображений использовали модель регенерации печени (18 крыс Wistar), которую индуцировали путем резекции печени с удалением разного объема (30 и 70 % массы) ткани. Печень забирали на 7-е сутки после резекции и проводили визуализацию методом FLIM. Конечный пул изображений состоял из 80 изображений контроля; 11 изображений при 30 % резекции; 17 изображений при 70 % резекции. В программе ImageJ (Fiji) для изображений размечали границы клеток в качестве масок для обучения НС. После чего изображения аугментировали.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-15-00263.

© И. Д. Щечкин, С. А. Родимова, Н. В. Бобров, А. М. Можеров, Д. С. Кузнецова, 2023

Результаты

Полученный пул использовали как тренировочный для обучения НС, основанной на трехканальном Unet++ с применением многокомпонентной функции потерь, включающей в себя BSA, Focal и Dice функции. НС была обучена находить границы клеток и сами клетки. Далее предсказания использовались для проведения поклеточной Instance сегментации. Точность составила более 0,8. Полученные ROI, представляющие собой отдельные клетки, были использованы для расчета кинетик изменения флуоресценции на основе восстановленных функций SPCImage.

Заключение

Таким образом, был разработан алгоритм, способный определять границы клеток с высокой точностью, выделять их на FLIM-изображении и рассчитывать соответствующие им параметры флуоресценции: времена жизни компонент и их вклады.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-43

**ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОДНО- И ДВУХЛЕТНИХ ЦИКЛОВ РАЗВИТИЯ
DENDROLIMUS SIBIRICUS НА ОСНОВЕ ДАННЫХ RNA-SEQ****STUDYING THE FEATURES OF ONE- AND TWO-YEAR DEVELOPMENT CYCLES
OF *DENDROLIMUS SIBIRICUS* USING RNA-SEQ DATA**М. Е. Якимова^{1,3}, В. В. Мартемьянов¹, Н. И. Ершов²¹*Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск*²*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*³*Новосибирский государственный университет*M. E. Yakimova^{1,3}, V. V. Martemyanov¹, N. I. Ershov²¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk*²*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*³*Novosibirsk State University*

✉ yakimova.2138@gmail.com

Аннотация

Dendrolimus sibiricus (сибирский шелкопряд) — важнейший вредитель бореальных лесов Азии. В цикле развития этот вид имеет факультативную летнюю диапаузу, что усложняет предсказание численности популяции. Это явление на сегодняшний день не имеет генетического объяснения. На основе транскриптомных данных, полученных с помощью RNA-seq, проведено сравнение дифференциальной экспрессии генов и транскриптов для двух типов развития сибирского шелкопряда.

Abstract

Dendrolimus sibiricus (Siberian silkworm) is the most important pest of the boreal forests of Asia. In the development cycle, this species has a facultative summer diapause, which complicates the population size prediction. This phenomenon has no genetic explanation to date. In this work we have compared differential expression of genes and transcripts for two types of development of the Siberian silkworm based on RNA-seq data.

Жизненный цикл насекомых, называемый генерацией или поколением, протекает у разных видов в течение неодинакового времени, от нескольких недель до десятка лет [1]. На некоторых стадиях может наблюдаться диапауза, сопровождающаяся понижением обмена веществ и прекращением питания [2]. Насекомые с облигатной диапаузой входят в нее на определенной стадии развития независимо от условий внешней среды. В то же время насекомые с факультативной диапаузой могут иметь поколения без замедления развития [3]. При неблагоприятных условиях внешней среды они впадают в диапаузу, в противном случае продолжают развиваться. Температура, световой период, пища и плотность популяции считаются основными сигналами окружающей среды, регулирующими наступление данного процесса.

На сегодняшний день используют передовые методы различных геномных и транскриптомных подходов для выяснения генетической основы в развитии насекомых. Однако сигналы и механизмы, определяющие развитие по пути диапаузы, остаются малоизученными, немногим более известны физиологические и биохимические события, сопровождающие такой вариант онтогенеза. Ключевой группой гормонов, участвующих в развитии членистоногих, является группа стероидных гормонов экдизонов [4]. Известно около десятка генов, участвующих в синтезе этих веществ. Также было выявлено несколько генов-кандидатов, управляющих диапаузой [5]. Это гены регуляции циркадного ритма и углеводного обмена.

В нашем исследовании мы сосредоточились на экономически важном вредителе хвойных лесов России — сибирском шелкопряде. Динамику численности вредителя трудно предсказать из-за его сложного жизненного цикла. Это, в свою очередь, добавляет трудностей с прогнозированием всплеск размножения и планированием инсектицидных мероприятий [6]. Жизненный цикл сибирского шелкопряда включает наряду с обязательной зимней диапаузой еще и летнюю факультативную диапаузу, встречающуюся только у части популяции [7]. Сравнительное транскриптомное исследование в нашем случае представляется относительно оптимальной отправной точкой в исследовании процессов, запускающих диапаузу.

Нами были получены две группы насекомых: с нормальным и отстающим развитием, по 10 особей в каждой группе. Из насекомых была выделена РНК из трех анатомических структур. Секвенирование библиотек кДНК было произведено на платформе Illumina NovaSeq. Из полученных данных RNA-seq был реконструирован транскриптом *de novo* сибирского шелкопряда с использованием программы Trinity. Для анализа дифференциальной экспрессии генов и транскриптов использовали программу kallisto и R-пакеты DESeq2 и DRIMSeq. Функциональную аннотацию выявленных групп дифференциально экспрессирующихся генов проводили на основе гомологии с известными белками инструментом InterProScan.

В ходе анализа было выявлено в среднем 1200 генов для трех методов оценки дифференциальной экспрессии. Среди них были найдены белки, имеющие домены связывания инсулиноподобного фактора роста (IPR017891, IPR000867), EGF-подобные домены эпидермального фактора роста (IPR000742), ферредоксины, которые опосредуют перенос электронов в ряде метаболических реакций (IPR006058, IPR017900) и интегрины (IPR015812).

Литература

1. Бей-Биенко Г. Я. Общая энтомология. М.: Проспект науки, 2008. 486 с.
2. Andrewartha H. G. Diapause in relation to the ecology of insects // *Biological Reviews*. 1952. Vol. 27, № 1. P. 50–107.
3. Numata H., Shintani Y. Diapause in Univoltine and Semivoltine Life Cycles // *Annual Review of Entomology*. 2023. Vol. 68. P. 257–276.
4. Kamiyama T., Niwa R. Transcriptional Regulators of Ecdysteroid Biosynthetic Enzymes and Their Roles in Insect Development // *Front Physiol*. 2022.
5. Karp X. Hormonal Regulation of Diapause and Development in Nematodes, Insects, and Fishes // *Front. Ecol. Evol*. 2021. Vol. 9.
6. Kirichenko N. I., Baranchikov Y. N., Vidal S. Performance of the potentially invasive Siberian moth *Dendrolimus superans sibiricus* on coniferous species in Europe // *Agricultural and forest entomology*. 2009. Vol. 11, № 3. P. 247–254.
7. Рожков А. С. Сибирский шелкопряд: автореф. дис. ... д-р биол. наук. Красноярск, 1965.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-44

ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУННЫХ КОМПАРТМЕНТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРОЦЕДУРЫ ДЕНОЙЗИНГА ДАННЫХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ТРАНСКРИПТОМИКИ 10X GENOMICS VISIUM*

REVEALING IMMUNE COMPARTMENTS USING DENOISING PROCEDURE OF SPATIAL TRANSCRIPTOMICS DATA FROM 10X GENOMICS VISIUM

П. С. Ямщиков, И. В. Ларионова

*Томский государственный университет
Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН*

P. S. Yamshchikov, I. V. Larionova

*Tomsk State University
Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center RAS*

✉ mriamshchikovpavel@gmail.com

Аннотация

Рак яичников имеет худший прогноз среди злокачественных гинекологических заболеваний. Иммунное микроокружение опухоли значительно определяет прогноз заболевания. 10x Genomics Visium позволяет анализировать иммунное микроокружение опухоли в контексте паренхиматозно-стромальных взаимоотношений. Данные Visium сопряжены с drop-out эффектом. В данной работе был подобран наиболее оптимальный путь денойзинга для выявления иммунных компартментов в ткани рака яичников.

Abstract

Ovarian cancer has worse prognosis among gynecological malignancies. Tumor immune microenvironment significantly impact on disease prognosis. 10x Genomics Visium enables analysis of tumor immune microenvironment in a context of parenchymal-stromal relationships. Visium data biased due to “drop-out” effect. In current study we define optimal denoising strategy to reveal immune compartments in tissue section of ovarian cancer.

Пространственное полнотранскриптомное профилирование позволяет изучать экспрессию генов в клетках непосредственно на срезе ткани в контексте паренхиматозно-стромальных взаимоотношений [1]. Рак яичников имеет худший прогноз среди злокачественных гинекологических заболеваний. Применение пространственной транскриптомики для изучения рака яичников может в значительной степени способствовать выявлению в опухоли и опухолевом микроокружении молекулярно-генетических механизмов, определяющих неблагоприятное течение заболевания. 10x Genomics Visium является доступным инструментом для проведения пространственного полнотранскриптомного профилирования. Однако ряд технических факторов, преимущественно связанных со сниженной эффективностью захвата транскриптов и низкой глубиной секвенирования, приводит к потере части информации о геной экспрессии (drop-out эффект). В данной работе был подобран наиболее оптимальный путь денойзинга для устранения drop-out эффекта и выявления иммунных компартментов в ткани рака яичников.

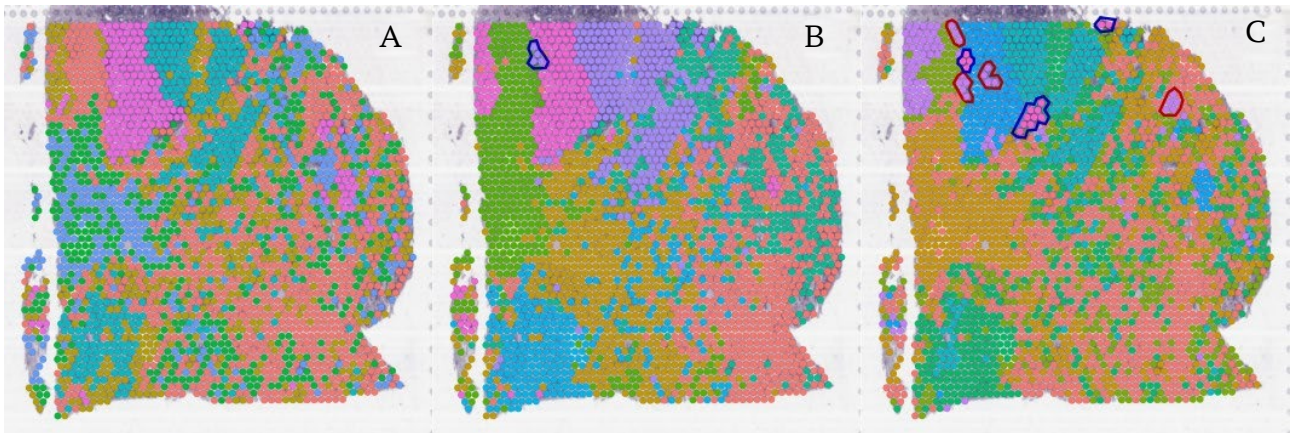
В качестве материала исследования использовали ретроспективный материал рака яичников биобанка НИИ Онкологии Томского НИМЦ. Исследование было проведено в соответствии с местным комитетом по медицинской этике. Пространственное полнотранскриптомное профилирование проводили с помощью 10x Genomics Visium, набором для FFPE образцов. Первичную обработку проводили в программе Space Ranger. Снижение размерности, кластеризацию, поиск дифференциальных маркеров и визуализацию данных проводили в пакете Seurat [2], в среде R. С помощью пакета alra [3] в среде R проводили денойзинг, используемый в scRNA-seq. С помощью программы Sprod [4] в командной строке Линукс проводили денойзинг с использованием соответствующего изображения ткани в высоком разрешении.

Было проведено три варианта анализа данных Visium среза ткани рака яичников. Первый вариант анализа проводился без процедуры денойзинга. Второй включал процедуру денойзинга с помощью alra, используемую для данных scRNA-seq. Третий включал денойзинг с помощью Sprod, разработанный для данных пространственной транскриптомики, включая Visium. Все три варианта анализа затем включали линейное снижение размерности.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-10021.

© П. С. Ямщиков, И. В. Ларионова, 2023

ности методом главных компонент, нелинейное снижение размерности методом UMAP, кластеризацию методом k-ближайших соседей и поиск дифференциальных маркеров кластеров.



Распределение кластеров на срезе ткани опухоли яичников. *A* — обработка без денойзинга. *B* — обработка с денойзингом для scRNA-seq. *C* — обработка с денойзингом для Visium. Синий — иммунные компартменты лимфоцитов, красный — иммунные компартменты макрофагов

С помощью анализа дифференциальных маркеров кластеров и распределения кластеров на срезе оценивали эффективность обнаружения иммунных компартментов на срезе рака яичников. На рисунке представлено распределение кластеров, полученных тремя вариантами анализа на срезе ткани. Вместе с данными дифференциальной экспрессии получили, что без проведения денойзинга не удается выявить отличные кластеры, соответствующие иммунным компартментам. Применение денойзинга от scRNA-seq частично позволяет выявить иммунные компартменты лимфоцитов, тогда как макрофагальные компартменты остаются необнаруженными. Применение денойзинга с пространственной информацией позволяет точно определить компартменты лимфоцитов, а также позволяет определить компартменты богатые макрофагами.

В ходе проделанной работы был определен наиболее оптимальный путь денойзинга данных 10x Genomics Visium, позволяющий выявить различные иммунные компартменты на срезе опухоли яичников.

Литература

1. Marx V. Method of the Year: spatially resolved transcriptomics // *Nature Methods*. 2021. Vol. 18 (1). P. 9–14.
2. Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data // *Cell*. 2021. Vol. 184 (13). P. 3537–3587.
3. Linderman G. C., Zhao J., Roulis M. et al. Zero-preserving imputation of single-cell RNA-seq data // *Nature Communications*. 2022. Vol. 13 (1). P. 192.
4. Wang Y., Song B., Wang S. et al. Spro for de-noising spatially resolved transcriptomics data based on position and image information // *Nature Methods*. 2022. Vol. 19 (8). P. 950–958.

РАЗДЕЛ II

БИОТЕХНОЛОГИИ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-45

**CONFIRMATION OF VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN PRODUCED
IN RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* CELLS ***

N. Y. Andreeva, Y. N. Davidyuk, S. Sahin, V. A. Zhirnova, S. Z. Validov, S. F. Khaiboullina, E. V. Martynova, E. Kabwe

Kazan Federal University

✉ natasha_andreeva_2000@mail.ru

Abstract

The N protein of orthohantaviruses is the most abundant viral protein synthesized early after infection and plays a crucial role in intracellular transportation and assembly of mature virions. The N protein was successfully produced and confirmed by SDS-PAGE and Western blotting, which is a crucial step in the sequences of procedures to develop antivirals against HFRS.

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) continues to impact human health worldwide. Among the most affected regions in Russia, the Volga Federal District accounts for most of the cases. HFRS is a zoonotic disease caused by *Puumala orthohantavirus* (PUUV) in Europe and Russia. The genome of PUUV consists of three-segment, namely small (S), medium (M) and large (L) single-stranded RNA of negative polarity, encoding a nucleocapsid protein (N protein), a precursor of surface glycoproteins and an RNA-dependent RNA polymerase, respectively [1]. The N protein is the most abundant viral protein synthesized early after infection and plays a crucial role in intracellular transportation and assembly of mature virions making it a target for the development of therapeutic drugs against HFRS [2].

Despite the great efforts in the studying the mechanisms of the immune response in HFRS patients, antivirals against HFRS are still far from being developed. Therefore, the aim of the work was to design a genetic construct for the expression of an N protein and confirm it with SDS-PAGE and western blotting in order to use it for purification.

The pET-28a(+) plasmid containing the nucleotide sequence of the PUUV nucleocapsid protein gene developed and expressed in recombinant *Escherichia coli* cells BL21(DE3)pLysS strain under different conditions.

The best condition to produce N protein was the induction of overnight *E. coli* cell culture by 1mM IPTG and incubation of the cells at 18 °C for 20 hours, with shaking at 100 RPM. The N protein with a molecular weight of approximately 51.5 kDa was identified. The expression of the protein was confirmed using SDS-PAGE and Western blotting. The SDS-PAGE analysis of the N protein showed that the protein was insoluble and remained in the pellet. The next step will be to purify this protein from the pellet using different conditions and use it for an enzyme-linked immunosorbent assay with the potential to develop a vaccine.

Thus, the N protein was successfully produced and confirmed by SDS-PAGE and Western blotting, which is a crucial step in the sequences of procedures to develop antivirals against HFRS.

References

1. Flick K., Hooper J. W., Schmaljohn C. S. et al. Rescue of Hantaan virus minigenomes. *Virology*. 2003. Vol. 306. P. 219–224.
2. Kabwe E., Davidyuk Y., Shamsutdinov A. et al. Orthohantaviruses, *Emerging Zoonotic Pathogens*. Pathogens. 2020. Vol. 9. P. 775.

*The study was approved by KFU Ethical Committee and was part of the Strategic Academic Leadership Program Priority 2030. The work was supported by RSF-DST grant № 22-44-02007.

© N. Y. Andreeva, Y. N. Davidyuk, S. Sahin, V. A. Zhirnova, S. Z. Validov, S. F. Khaiboullina, E. V. Martynova, E. Kabwe, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-46

NEW BENZIMIDAZOLE NUCLEOSIDES

A. O. Arnautova, I. A. Aleksakhina, A. L. Kayushin, I. D. Konstantinova

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

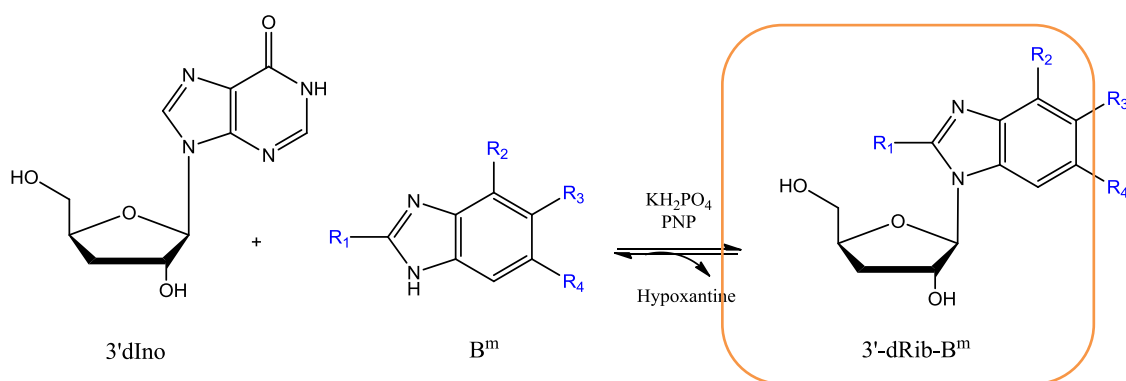
✉ arnautova_ibch@mail.ru

Abstract

Modified nucleosides are one of the most important classes of antimetabolites actively used in practical medicine as antiviral and antitumor drugs. There are two main methods of producing nucleoside analogs: chemical and enzymatic. The purpose of this study is to develop an efficient method for the preparation of new benzimidazole nucleosides by enzymatic synthesis.

Compounds containing benzimidazole fragment exhibit pronounced antiviral, antispasmodic, neuroleptic, antihistamine activity. The biological activity profile of benzimidazole nucleosides can be changed by introducing a substituent into the benzimidazole ring and/or carbohydrate residue.

A series of new modified substituted benzimidazole nucleosides (3'-d-Rib-B^m) were prepared by enzymatic method with yields from 8 to 72 % and over 95 % purity. Scheme of transglycosylation reaction is shown in the Figure.



Scheme of transglycosylation reaction.

R₁ = H, NH₂; R₂ = H, F; R₃ = H, F, OMe; R₄ = H, F, OMe

3'-deoxyinosine (3'-d-Ino) and substituted benzimidazoles (B^m) were used as substrates in the transglycosylation reaction in the presence of genetically engineered purine nucleoside phosphorylase (PNP).

In the first step, each reaction was optimized for substrate ratio and amount of PNP. Conditions: 50 °C, phosphate buffer 2 mM (pH 7.0). The next step was preparative synthesis followed by isolation of enzymatic reaction products. Obtained 3'-d-Rib-B^m were confirmed by NMR and mass-spectrometry. In the case of asymmetrically substituted benzimidazole bases N1 and N3 regioisomers were formed.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-47

DIFFERENT TYPES OF DNA-NANOSENSORS VISUALIZATION

G.A. Bobkov, M. Y. Berezovskaya, M. O. Potudanskaya, M. S. Rubel

SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

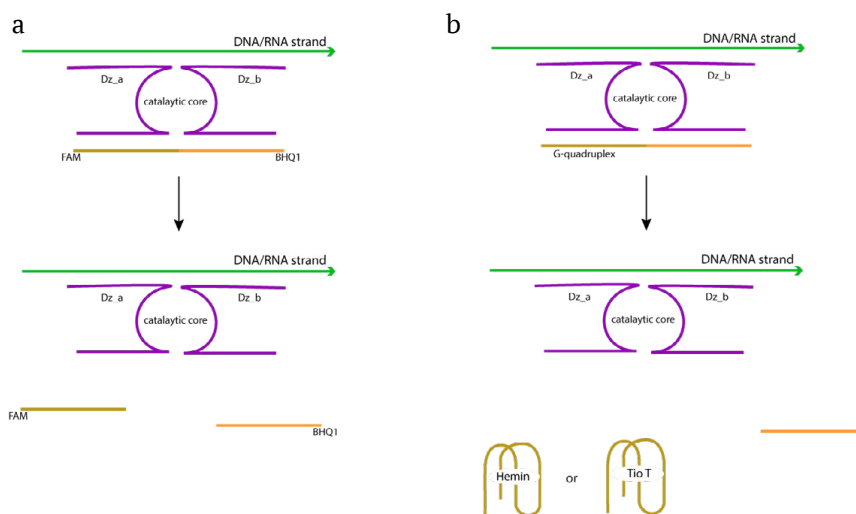
✉ bobkov@scamt-itmo.ru

Abstract

Inflammation of tissues lining the brain and spinal cord is known as meningitis. *Neisseria meningitidis* is typically to blame for it and can be fatal within 24 hours of infection. Here we offer a rapid detection of this pathogen suitable for Point-of-care diagnostics. We used isothermal amplification and different types of multicomponent detection systems.

Point-of-care (POC) diagnostics is one of the modern trends in disease detection, focusing on fast solutions with easy-available equipment and reagents. POC requirements can be applied both to pathogen detection and flawed gene identification. Some methods of the direction are based on isothermal amplification (LAMP, NASBA, SDA) and their modifications. The LAMP approach is heard the most. It has a short reaction time (from 15 minutes), but also often leads to false positive results thus careful primers selection is required. This paper shows one of the methods that allows distinguishing between true positive and false positive results of LAMP amplification. It suggests a sequential testing of the amplified products with DNAzyme, DNAzyme-containing DNA-nanomachines or G-quadruplexes.

There were two main ways of detection were used in research. First type, is using DNAzymes and DNA-machines cleaved the Molecular beacon probe (MB-probe) followed by measurement of fluorescence intensity (see Figure, a). Second type, DNAzymes and DNA-machines cleaved special sequence. Product of that reaction fold to the G-quadruplex followed binds with specific molecule. In presence of Thioflavin T it can be detected by the measuring of fluorescence intensity; in presence of Hemin and H_2O_2 it can be detected by the naked-eyes via the tubes color changing (see Figure, b).



Scheme of experiment: *a* — DNAzymes cleave the MB-probe; *b* — DNAzymes cleave G-quadruplex followed binds with Hemin or Thioflavin T (Tio T)

Genomic DNA of *Neisseria meningitidis* was used for the experiments. The product was generated by LAMP isothermal amplification using Bst polymerase (SibEnzyme), 6 mM $MgSO_4$ (SibEnzyme), 0.01 % ethylene glycol, dNTP (Evrogen), specific primers. Amplification conditions: 30 minutes, 65 °C. The amplification result was confirmed in a 2 % agarose gel. False-positive product were formed after room-temperature incubation of the reaction mix before the actual incubation. To distinguish between false and true positive amplification products, specific DNA-nanomachines based on DNAzymes were used, which were created using the NUPACK and Mfold programs. Detection conditions: 120 minutes, 65 °C. The signal was detected using a Tecan fluorometer at fluorescence excitation and emission wavelengths of 480 and 520 nm for MB-probe, 442 and 487 nm for the Thioflavin T or naked-eye or spectrometer for the Hemin and H_2O_2 .

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-48

ENGINEERING POLYMICROBIAL AGGREGATES FOR PETROLEUM BIOTECHNOLOGY

I. Rybkin¹, A. Humam², M. Alahmari², M. Orlov¹

¹*Aramco Innovations, LLC, Moscow*

²*Saudi Aramco, Dhahran, Saudi Arabia*

✉ iaroslav.rybkin@aramcoinnovations.com

Abstract

Bacterial surface modification through electrostatic deposition of polyelectrolytes with opposite charges enables the assembly of various microbial cells into cellular aggregates that have versatile applications. This study showcases cutting-edge methods for altering the surface charge and illustrates numerous scenarios such as wastewater treatment or physiology control of cells, which can be utilized in petroleum biotechnology applications.

Application of microbial-based technologies plays an important role in the oil and gas industry, serving various purposes such as wastewater treatment, biodegradation, and bioremediation. Additionally, they have the enormous potential to be utilized in synthesizing high-value products from crude oil and oil fractions, which can also reduce environmental impact during product manufacturing. The use of bacteria for these applications has led to rapid development in biotechnology, providing benefits such as waste reduction and sustainability development while opening new pathways for chemical synthesis.

The biodegradation and synthesis of high-value products require the use of various bacteria to consequently transform the desired compound into the final product. To achieve this, it is necessary to develop methods for structuring bacterial communities in desired way to allow organized transfers and conversions of compounds among cells.

One of the well-known examples of consequent transformation of the compounds between cells is a biofilm. The biofilm is a multispecies cellular aggregate that allows organized flow of compounds between cells that are confined in a matrix. Since not all microbes are well-compatible due to lack of conditions that promote attachment between cells, it complicates construction of desired pathways for product manufacturing. In order to make microbes compatible, it is necessary to modify the bacterial cell surfaces to allow their interaction at a closer distance and spatially orient the cells to enable appropriate transfer of metabolites similarly as it occurs in natural biofilms.

Since the bacterial surface is mainly negatively charged, it can be altered by depositing oppositely charged polyelectrolytes. The altered surface charge enables strong electrostatic interaction between cells or cells and surfaces instead of repulsion of unmodified cells. However, the complexity of the cell wall structure, fast division rates, and physiological differences between cells complicate the deposition of polyelectrolytes and may cause unwanted toxicity or uncontrollable aggregation.

Therefore, we aimed to summarize existing knowledge about the methods of electrostatic modification of the bacterial cell surface for artificial structuring microbial communities. The present study finds that bacterial cells can be efficiently modified with polyelectrolytes without causing any toxicity to bacteria. The modified surface significantly prolongs the attachment of cells on inanimate surfaces and allows for the production of bacterial aggregates composed of various cells. Such a strategy of microbial cooperation was found to significantly improve wastewater treatment from paper industry, outperforming conventional treatment of persistent pollutants. Therefore, we identified that polymicrobial aggregates and methods of their preparation have potential applications in the oil and gas industry for controlling cell physiology, reducing the attachment of unwanted microbes and treating persistent pollutants.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-49

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES RELEASING CASSETTE FOR CANCER THERAPYA. A. Salimova¹, V. D. Drozd¹, D. S. Rybalko¹, A. A. Eldeeb^{1,2}, A. A. Dedovskaya⁵, D. M. Kolpashchikov⁴⁻⁶¹*SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*²*Almetyevsk State Oil Institute*³*Gymnasium No. 526, Saint Petersburg*⁴*Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA*⁵*Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA*⁶*National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA*

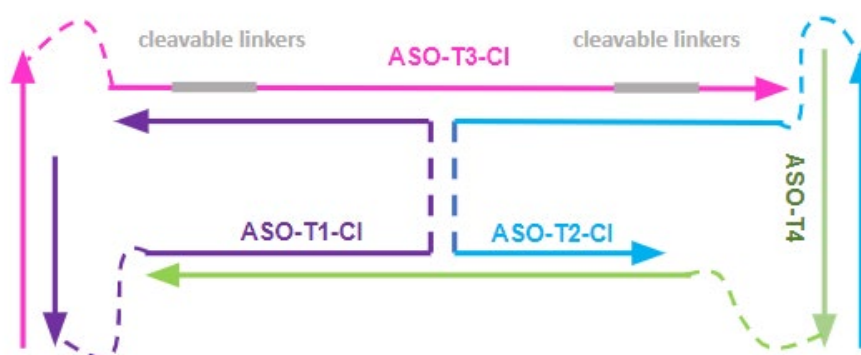
✉ salimova@scamt-itmo.ru

Abstract

Cancer gene therapy is a challenging area of research. Cancer therapy aims to target mutated genes that play crucial roles in tumorigenesis. However, this approach often encounters challenges such as low efficiency and off-target effects. Consequently, the number of drugs approved for clinical use remains limited. Here, we suggest a novel approach in cancer therapy — a DNA construct that is able to target vital housekeeping genes in a cancer-marker dependent manner.

Cancer, a complex and multifaceted disease, continues to present a significant challenge to the global healthcare system. Over the years, remarkable advancements have been made in understanding the underlying molecular complexities and heterogeneity of cancer. Among the various treatment strategies, targeted gene therapy has emerged as a promising approach to combat cancer by specifically targeting aberrant molecular pathways driving tumorigenesis [1]. However, one of the biggest challenges in this approach is the identification of suitable biomarkers and effectively targeting them. Additionally, targeted gene therapy still faces limitations, such as potential off-target effects, rapid acquisition of drug resistance, and issues regarding overall efficiency [2]. Thus, it becomes crucial to explore novel approaches in cancer treatment. Among the emerging strategies is the opportunity to target essential housekeeping genes specifically present in cancer cells. To ensure selective targeting of cancer cells, it is important to design therapeutic agents that are activated in a marker-dependent manner, relying on specific cancer markers for treatment activation.

One approach enabling the cleavage of targeted RNA in a cancer marker-dependent manner is based on the utilization of antisense oligonucleotides (ASO) and is known as Binary Antisense Oligonucleotides (BiASO) [3]. ASO is a short, single-stranded DNA molecule designed to bind specifically to RNA and recruit the enzyme RNase, leading to the cleavage of the target RNA. The BiASO construct encompasses two components that come together in the presence of the cancer marker and bind to the target RNA, facilitating marker-dependent activation.



The scheme of ASO Releasing Cassette (ARC). Each line represents a sequence of oligonucleotides.

The construct consists of 4 oligonucleotides. ASO-T3-CI holds ASO part. When the construct is disassembled, the cleavable linkers, which are exposed naked DNA, are susceptible to cleavage by nucleases, resulting in the release of individual ASO molecules

By implementing the idea of BiASO, we have created a more stable and efficient construct that has the potential of efficiency of the classical ASO only in the presence of the cancer marker. In addition, it has modifications, such as phosphorothioate and 2'-O-Methyl, that protect the entire construct from nucleases and protect the cancer marker from being cleaved [4]. The construct is called ASO Releasing Cassette, which, when assembled, comprises four different oligonucleotides that hold the construct together and facilitate the binding of the ASO portion to the construct (see Figure). However, when the construct encounters the cancer marker, it disassembles, resulting in the release of the individual single-stranded ASO molecule. This liberated ASO is then available to bind to the target RNA for further downstream interactions.

ARC was explored in a proof-of-concept *in vitro* study to target Green Fluorescent Protein (GFP) in a K562 cell line transformed to express a GFP gene. As for the marker, we used a synthetic molecule that represented a KRAS gene mRNA — a common cancer marker mutated in 25 % of cancers. The transfection results were assessed using the flow cytometry method by analyzing the fluorescence emitted by GFP.

The examination showed up to 30 % suppression of fluorescence in the presence of the cancer marker and 0,5 % in the absence of it, at the concentration of 100 nM. This results in a cleavage-to-background ratio of 60, providing valuable insights into the marker-dependence of our construct.

As we move forward, the next critical step will involve choosing suitable housekeeping genes and designing the construct to cleave their mRNA in a marker-dependent manner. This will open up new possibilities for more effective and precise cancer treatment strategies.

References

1. Pahle J., Walther W. Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy // Expert opinion on biological therapy. 2016. Vol. 16, № 4. P. 443–461.
2. Zhong L. et al. Small molecules in targeted cancer therapy: Advances, challenges, and future perspectives // Signal transduction and targeted therapy. 2021. Vol. 6, № 1. P. 201.
3. Drozd V.S. et al. Binary Antisense Oligonucleotide Agent for Cancer Marker-Dependent Degradation of Targeted RNA // Nucleic Acid Therapeutics. 2022. Vol. 32, № 5. P. 412–420.
4. Sharma V.K., Sharma R.K., Singh S.K. Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials // MedChemComm. 2014. Vol. 5, № 10. P. 1454–1471.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-50

EXPLORING THE USE OF HERBAL EXTRACTS FOR ACNE TREATMENT

E. N. Sapozhnikova

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ k.sapozhnikova@hotmail.com

Abstract

According to WHO, about 85 % of the world's adolescents suffer from acne. However, due to the increase in the number of new infections and the increase in the number of cases of bacterial resistance to antibiotics, it is necessary to study the antibacterial properties of plants growing in our habitat strip. These drugs, while inhibiting the growth of pathogens and reducing the synthesis of sebaceous glands, will expand the list of medicines to combat acne.

The work aims to study the antimicrobial properties of plant extracts and the possibility of their use in the treatment of acne.

Significance and novelty of the study

1. The low frequency of the formation of resistant forms of the identified microorganisms to the antimicrobial action of plant extracts *Hypericum perforatum*, *Urmex confertus* and *Marticaria chamomilla* was investigated.

2. For the first time, a combination of plant substances of St. John's wort, horse sorrel and pharmacy herb was selected.

3. The necessary concentrations were determined to achieve the best bactericidal and bacteriostatic action.

The course of the study

The study involved 20 students of my institute aged 18–22. The material for the experiment was the contents of pustules and comedones.

The isolated microorganisms were identified (sowing a smear from the skin on nutrient media, followed by isolation of infectious agents, determination of their type/genus).

The scheme of preparation of extracts:

- 1) dispersion of plant raw materials;
- 2) extraction of biologically active substances of plant origin;
- 3) separation of the system.

After obtaining propylene glycol and aqueous extracts of various concentrations (5 %, 10 %, 15 %) from the root of horse sorrel, St. John's wort and chamomile, their resistance and sensitivity to the seeded microflora were determined by the disco-diffusion method. Different concentrations were used to determine the optimal content of active components that inhibit the growth of pathogenic microflora.

Results

The most common pathogenic microorganisms that are the causative agents of acne were found (the most frequent were representatives of the *Micrococcaceae* family: *Staphylococcus aureus* 42.5 % and *Staphylococcus epidermidis* 35 %, *Streptococcus* spp. was less common (12.5 %). In 7.5 % of cases, *Enterobacteriaceae* spp. was found in patients, and in 2.5 % *Propionibacterium acnes*). The most effective raw materials were selected and the optimal concentrations of extracts inhibiting the growth of pathogenic microorganisms isolated from patients with acne were investigated. The best results were observed in propylene glycol extract of St. John's wort at a concentration of 15 %, propylene glycol extract of chamomile pharmacy at a concentration of 15 % and aqueous extract of horse sorrel at a concentration of 15 %. These data allow us to recommend these extracts when creating a new external medicinal product that will have a high therapeutic effect with minimal toxic effects.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-51

CHEMO-ENZYMATIC SYNTHESIS OF NEW RIBAVIRIN ANALOGS

O. S. Smirnova, I. D. Konstantinova

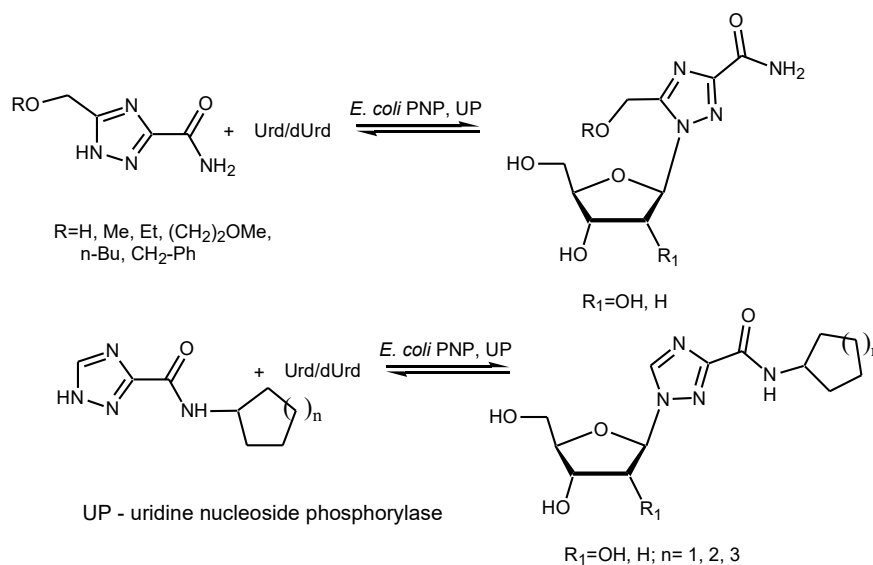
Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ gescheites@gmail.com

Abstract

Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamid, Virazole) is a modified nucleoside effective against a wide spectrum of RNA and DNA viruses.

The chemo-enzymatic approach to the synthesis of ribavirin and its new analogues displaces the classic multistage chemical processes and allows carrying out the key reaction (transglycosylation) with high efficiency, region- and stereo-selectivity. N-Cyclic aliphatic and aromatic 1,2,4-triazole carboxamides were found to be good substrates for *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP) with the extent of conversion to the respective nucleosides up to 99 % (see Figure). Ribo- and 2-deoxyribo-nucleosides of N-substituted 1,2,4-triazole carboxamides were synthesized with a 30–90 % yield. Unfortunately, this approach to the synthesis of nucleosides cannot be used in the synthesis of arabino- and 2-fluoroarabinonucleosides of 1,2,4-triazole. Investigation of antiviral activity of the synthesized compounds in the models of hepatitis C, herpes simplex virus type 2, type A, and B flu viruses is currently being conducted in the Ivanovsky Institute of Virology. The test results of antiviral activity of the synthesized compounds will be published later.



Chemo-enzymatic synthesis of new ribavirin analogs

A series of 5-alkyl/aryl-oxymethyl 1,2,4-triazol-3-carboxamide nucleosides was synthesized (see picture). Surprisingly, ability of PNP to synthesize ribonucleosides and 2'-deoxyribonucleosides having structurally diverse alkyl(aryl) oxymethyl substituents at the 5 position of 1,2,4-triazol-3-carboxamide has been discovered. It has been shown that the enzymatic synthesis of 2'-deoxyribonucleosides proceeds with better conversion and faster (up to 50 h) than the synthesis of ribonucleosides (more than 300 h). Therefore, ribonucleosides were synthesized by chemical glycosylation of triazoles by 2,3,4,5-tetra-O-acetyl-D-ribose in the presence of bis(4-nitrophenyl) phosphate. 2'-Deoxyribonucleosides were synthesized by the transglycosylation reaction with *E. coli* PNP.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-52

A COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT ISOLATION PROTOCOLS OF MURINE NEUTROPHILS FROM BONE MARROW AND SPLEEN*K. Sounbuli^{1,2}, N.L. Mironova¹, O.V. Markov¹, L.A. Alekseeva¹¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*

✉ Khetam.sounbuli.edu@gmail.com

Abstract

Neutrophils are considered the main player in innate immunity. In the last few years, they were involved in different physiological conditions and diseases. However, progress in the field of neutrophil biology is relatively slow due to several difficulties in neutrophil isolation and studying in culture. Here we compare three protocols based on density-gradient method and immunomagnetic method for mouse neutrophil isolation from the bone marrow and spleen.

Neutrophils represent the most abundant cell type of leukocytes in human blood and the second most in mice. They represent the first line of defense against pathogens. Neutrophils have gained great interest in the last few years due to their novel roles in different physiological conditions and diseases, including cancer. Despite its recently gained importance, progress in the field of neutrophil biology is relatively slow due to several difficulties in neutrophil isolation, handling and studying in culture. Here we compare three protocols for mouse neutrophil isolation from the bone marrow and spleen.

C57Bl/6 male mice aged 3–4 months were euthanized by cervical dislocation. Bone marrow and spleen were harvested, and cell suspensions were prepared. Neutrophil isolation was performed using Ficoll 1.077/1.119 g/ml density gradient [1], Ficoll 1.083/1.090/1.110 g/ml density gradient [2] or using immunomagnetic method of negative selection (EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment Kit). The different protocols were compared regarding sample purity, viability, yield, and cost. Yield and viability were measured with TC20 Automated Cell Counter (BIO-RAD, USA). Flow cytometry analysis was performed to assess the purity of samples using a NovoCyte 3000 flow cytometer (ACEA Biosciences, USA).

In case of bone marrow, cell viability was higher than 90 % in all protocols. The Ficoll 1.083/1.090/1.110 protocol led to the lowest sample purity 58.9 ± 4.3 % and yield $(0.5 \pm 0.1) \times 10^6$ cells compared with other protocols. As expected, neutrophil isolation using immunomagnetic method led to the highest values in all studied parameters: high sample purity 77.0 ± 5.6 %, high viability 94.5 ± 1.5 %, and high yield $(13.5 \pm 1.6) \times 10^6$ cells. In comparison with negative selection, the Ficoll 1.077/1.119 protocol was considerable with comparable sample purity (77.0 ± 5.6 % vs 65.5 ± 2.6 % respectively) and a sufficient yield for different studies $(8.7 \pm 3.7) \times 10^6$ cells.

The spleen is practically not used as a source of neutrophils by researchers due to the low yield, regardless of the isolation method. Nevertheless, spleen neutrophils can be used for studying their functional state in various pathological processes. Unfortunately, none of the studied protocols was sufficient to gain a pure spleen neutrophil population. The highest purity was gained using immunomagnetic method of negative selection 40.2 ± 2.7 %, while density-gradient protocols were obviously not suitable for splenic neutrophil isolation (sample purity < 5 %). Based on the obtained results, immunomagnetic positive selection for splenic neutrophil isolation was applied. Splenocytes were stained with rat anti-mouse Ly6G and then incubated with magnetic beads bound with sheep anti-rat IgG (Dynabeads™). Then, cells were separated using a magnetic field. The method showed high sample purity (> 99 %) and yield $(0.7 \pm 0.2) \times 10^6$ cells from one spleen.

In summary, bone marrow is a good choice for separation of neutrophils suitable for functional analysis with high purity and yield using 1.077/1.119 g/ml density gradient protocol or negative selection kits, whereas immunomagnetic positive selection method could be applied for splenic neutrophil isolation.

References

1. Swamydas M., Lionakis M. S. Isolation, purification and labeling of mouse bone marrow neutrophils for functional studies and adoptive transfer experiments // *J. Vis. Exp.* 2013. № 77.
2. Boxio R. et al. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils // *J. Leukoc. Biol. Oxford Academic.* 2004. Vol. 75, № 4. P. 604–611.

*The work was supported by RSF grant № 22-14-00289.

© K. Sounbuli, N. L. Mironova, O. V. Markov, L. A. Alekseeva, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-53

HETEROTROPHIC MICROALGAE CULTIVATION TECHNOLOGIES FOR THE PRODUCTION OF USEFUL SUBSTANCES AND BIOPRODUCTS

A. D. Vidler

ITMO University, Saint Petersburg

✉ advidler@itmo.ru

Abstract

The research evaluates methods for the production of useful substances from microalgae. Growing microalgae is more productive and environmentally friendly than cultivated plants. The microalgae market was worth \$939.4 million in 2020 and is still growing. However, high cost of production is an obstacle. Technologies to cultivate microalgae under heterotrophic conditions will improve production control and prevent contamination.

The aim of our study is to review the existing methods of cultivation of microalgae, especially under heterotrophic conditions. The aim is also to find the best microalgae species and strains for heterotrophic cultivation and the production of useful substances for a wide range of biotechnological applications.

Microalgae are unique organisms to which we owe most of the oxygen on our planet. Microalgae are single-celled photosynthetic organisms that live in water, air, earth, and even ice. These organisms are rich in nutrients such as proteins, polyunsaturated fatty acids, vitamins and other bioactive compounds. Microalgae can be produced without the use of arable land, and the zonal productivity of microalgae is much higher than that of crops. Many species of algae are salt tolerant, therefore seawater can be used for cultivation. Furthermore, some strains could grow under heterotrophic conditions in closed systems without light.

Microalgae takes up CO₂, emits oxygen, produce nutrients and could grow in wide range of conditions with great productivity, but there are still no cheap technologies to compete other sources of proteins and other nutrients, such as livestock and agriculture. Research and Markets reports that amid the COVID-19 crisis the global microalgae market, estimated at \$939.4 million in 2020, is projected to reach a revised size of \$1.3 billion by 2027, growing by 5.3 % over the 2020–2027 period. To compare, the global livestock market size is \$5.9 billion in 2021 and it is expected to reach around \$16.4 billion by 2030. Microalgae are environmentally friendly and consistent with the Sustainable Development Goals. In particular, the development of the microalgae market can cover 8 of the 17 UN SDGs: zero hunger; good health and well-being; clean water and sanitation; affordable and clean energy; industry, innovation and infrastructure; responsible consumption and production; climate action and the life below water. Additionally, it is perfect for circular economy.

The main obstacle to the development of the microalgae market at a level competitive to classical markets is the high cost of production. Today most of microalgae is produced in open ponds, which are hard to scale and easy to contaminate. With open ponds, we do not use the main advantage of microalgae as an organism — they grow in volume, not on the surface. However, because of the high density, it is difficult to provide light for photosynthesis for all the biomass. This problem is partly solved by using photobioreactors, which are long transparent tubes. However, there is another way to solve the problem, which is to use the ability of microalgae to grow under heterotrophic conditions. The development of technologies for scalable cultivation of microalgae under heterotrophic conditions will prevent unnecessary contamination and allow full control over the properties of the resulting biomass. Moreover, metabolic and genetic engineering of algae can provide significant progress in creating new and promising methods to produce biologically active substances for a wide range of biotechnological applications. This could serve as a step toward creating a universal process for producing useful products and components for areas such as biofuels, cosmetology, nutrition, medicine, food and feed industry. With full control over the environment of the grow, the process will be reproducible and easier to scale.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-54

ENRICHMENT OF YEAST WITH MICROELEMENTS AS AN OPPORTUNITY TO ELIMINATE MICRONUTRIENT DEFICIENCY IN NUTRITION *

T. V. Yuraskina, E. N. Sokolova, N. A. Fursova, E. M. Serba

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology, Moscow

✉ tatyanaavladyuraskina@gmail.com

Abstract

Studies in the field of micronutrient enrichment of yeast with 4 different trace elements: iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), chromium (Cr) were carried out. The possibility of yeast enrichment with the production of bio-preparations with both a monomicroelement profile and combined fortification with two microelements was experimentally confirmed. The possibility of enriched yeast usage in food production was confirmed. The possibility of enrichment of inactivated yeast fermentolysates was studied. The perspective of baker's yeast as a source of bio-preparations of trace elements was proved.

Introduction

Currently, the problem of macro- and micronutrient deficiency in the dietary patterns of the population remains acute [1]. One of the possible options for the prevention of nutrient deficiency is the development of biotechnological methods for obtaining food ingredients. Based on these ingredients it is possible to obtain products that perform a complementary function [2]. Priority directions of development were considered methods of obtaining biological products promising for the prevention of iron deficiency anemia and type II diabetes mellitus. These diseases affect about 20.1 % and 5.8 % of the total population of the Earth, respectively [3, 4]. One of the promising sources of ingredients is the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [5]. *Saccharomyces* is a genus of microorganisms widely used in the food industry. Yeast are a source of protein, B vitamins, ergosterol, etc. [6, 7].

The aim of the study was the development of a method of baker's yeast enrichment with microelements.

Materials and methods

The object of the study was the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* from the collection of microorganisms of the All-Russian Research Institute of Food Biotechnology. Enrichment was carried out by adding solutions of inorganic salts-sources of trace elements into the growth medium. Also inactivated yeast fermentolysates were fortified. Determination of the trace elements content was carried out by spectrophotometric methods and using atomic absorption spectrometry. The determination of crude protein was carried out by the Kjeldahl method. Bread samples were obtained from one batch of raw materials and using one strain of yeast.

Results

The enrichment of yeast with monomicroelements in various dosages was investigated. The following optimal dosages were noted: 500 mg Fe/dm³, 250 mg Cu/10dm³, 250 mg Zn/dm³, и 500 µg Cr/dm³ (Fig. 1, a). At the same time, an increment of crude protein level was reached by 11.2–26.3 %. The microscopy of samples obtained on media with optimal dosages of salts did not reveal a significant inhibitory effect on the culture in comparison with the control sample.

Combined enrichment with two trace elements was studied. The dosages of iron and zinc were chosen as significant factors. The dosages of copper and chromium were selected as above (Fig. 1, b). The following optimal dosages were noted: 500 mg Fe/dm³ + 25 mg Cu/dm³; 250 mg Zn/dm³ + 500 µg Cr/dm³. At the same time, an increment of crude protein level was reached by 11.8 ± 0.6 % (Fe + Cu) and 30 ± 1.5 % (Zn + Cr).

The possibility of using the obtained enriched bio-preparations in food production was studied. The bread samples with complete replacement of yeast without enrichment for experimental samples were obtained (Fig. 2). According to the results, it was noted that the usage of the Fe + Cu variant is possible with partial replacement of traditional yeast. On the example of bread, the usage possibility of yeast enriched with microelements was confirmed. Since these form of trace elements is not included in the list of elements that approved by TR CU 021/2011 "On Food Safety", it is necessary to pass the required safety tests.

* The research was funded by State Assignment.

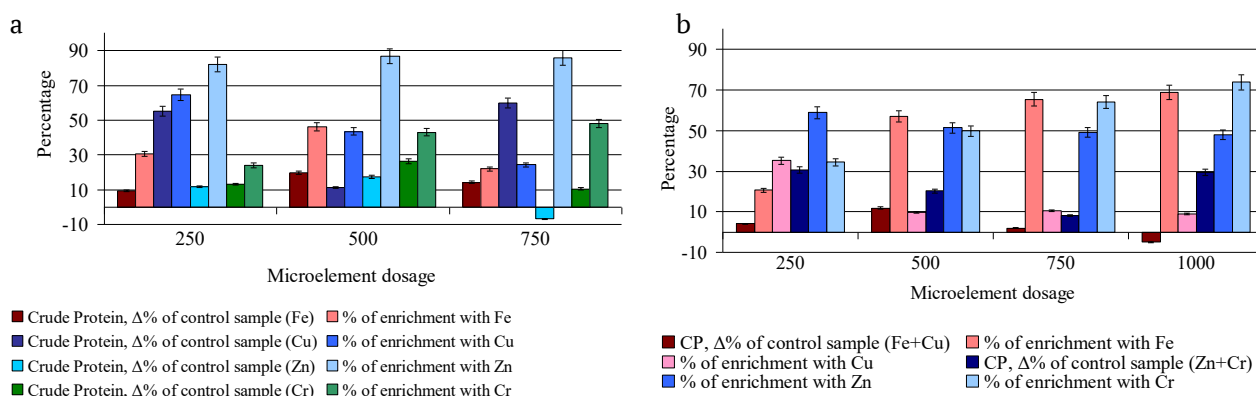


Fig. 1. Indicators of the enrichment with microelements percentage and the crude protein content in yeast samples enriched with monomicroelements (a), pairs of microelements (b)

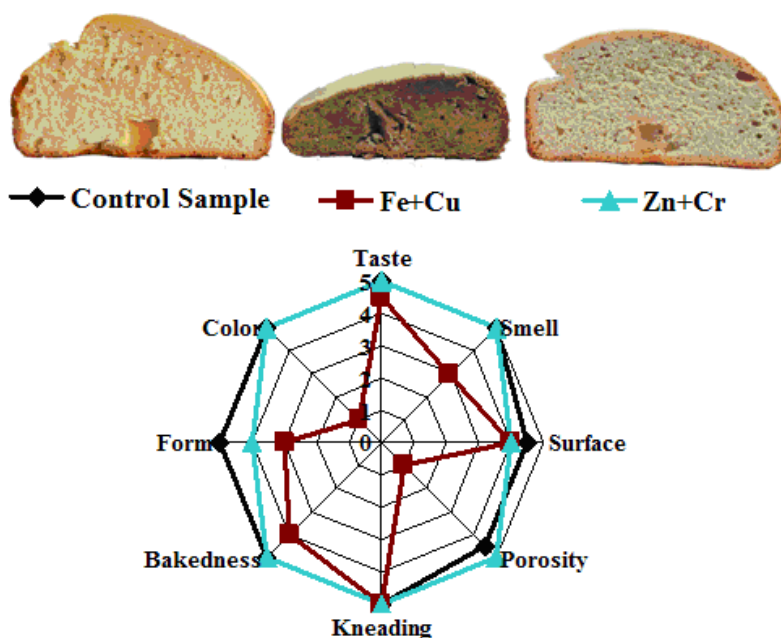


Fig. 2. Profilogram of experimental bakery products samples

The possibility of enrichment of inactivated yeast fermentolysates was investigated. Pre-inactivated and hydrolyzed yeasts were enriched with salt solutions with optimal concentrations. It was noted that using fortification of fermentolysates an increment in the percentage of enrichment by 1.7–2.8 times was reached compared to the options with the adding of microelements into the growth medium.

When calculating the percentage of replenishment of the recommended daily requirement (RDP) in trace elements according to 2.3.1.0253-21 guidelines, it was noted that adding 100 g of enriched bread to the diet will provide the body with Fe by 31.7 ± 1.6 % and Cu by 21.1 ± 1.1 %, in Zn by 68.5 ± 3.4 % and in Cr by 192.9 ± 9.6 %; and 1 g of fortified inactivated yeast fermentolysate will provide the body with 20.95 ± 1.0 % Fe and 5.86 ± 0.3 % Cu, 12.00 ± 0.6 % Zn and 5.31 ± 0.3 % Cr.

Conclusion

Based on the obtained data, the problem of micronutrient deficiencies can be partially solved by introducing food ingredients and products based on enriched yeast into the diet. These ingredients have the potential to pass all the required safety tests and be used in the food industry.

References

1. Hamrick C., Chen G. The challenges of future foods from prevention of nutrient deficiencies to the management of diabetes // Journal of Future Foods. 2021. Vol. 1 (1). P. 47–57. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.08.001>.

-
2. Shubham K. et al. Iron deficiency anemia: A comprehensive review on iron absorption, bioavailability and emerging food fortification approaches // *Trends in Food Science & Technology*. 2020. Vol. 99. P. 58–75. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.021>.
 3. Das T. et al. Alterations in the gut bacterial microbiome in people with type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy // *Scientific reports*. 2021. Vol. 11 (1). P. 2738. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82538-0>.
 4. Kumar S. B. et al. Iron deficiency anemia: efficacy and limitations of nutritional and comprehensive mitigation strategies // *Nutrients*. 2022. Vol. 14 (14). P. 2976. URL: <https://doi.org/10.3390/nu14142976>.
 5. Jach M. E. et al. Yeast protein as an easily accessible food source // *Metabolites*. 2022. Vol. 12 (1). P. 63. URL: <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>.
 6. Kessi-Pérez E. I. et al. Yeast as a biological platform for vitamin D production: A promising alternative to help reduce vitamin D deficiency in humans // *Yeast*. 2022. Vol. 39. № 9. P. 482–492. URL: <https://doi.org/10.1002/yea.3708>.
 7. Bratosin B. C., Darjan S., Vodnar D. C. Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition // *Sustainability*. 2021. Vol. 13 (16). P. 9284. URL: <https://doi.org/10.3390/su13169284>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-55

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТА ХИТИНАЗЫ В МЯСНОЙ ОТРАСЛИ APPLICATION OF THE CHITINASE ENZYME IN THE MEAT INDUSTRY

Д. Т. Азоян, Д. Р. Скворцова

Российский биотехнологический университет, Москва

D. T. Azoyan, D. R. Skvortsova

Russian Biotechnological University, Moscow

✉ azoyandavidmgupp@mail.ru, dskvortsova19@gmail.com

Аннотация

С ростом потребления продуктов питания повышается актуальность исследования различных добавок, которые будут обладать соответствующими функциональными свойствами. Среди мясных продуктов рубленые полуфабрикаты пользуются высоким спросом. Одной из часто добавляемых к полуфабрикатам начинок являются грибы. Целью работы является исследование эффективности применения фермента хитиназы в мясной отрасли.

Abstract

With the increase in food consumption, technologists are exploring various additives that will meet the functional properties. Considering meat products, chopped semi-finished products are in high demand. The range of fillings for these products can be diverse, including mushrooms. This work aims to study the effectiveness of application of the chitinase enzyme in the meat industry.

Хитин является основной клеточной стенки грибов. Однако данный полисахарид не усваивается в желудочно-кишечном тракте. Поэтому внедрять продукты питания, содержащие хитин, проблематично, так как не у каждого человека быстрый обмен веществ [1].

Решением этой проблемы может стать применение фермента хитиназы, который разрушает хитиновый слой, образуя глюкозамин, всасывающийся в ЖКТ до 99 %. Хитиназа широко распространена у микроорганизмов, водорослей, насекомых, ракообразных и моллюсков. В зависимости от происхождения, у ферментов различный уровень pH. У водорослей этот показатель находится в диапазоне 4–9, у насекомых — 4,7–9,3, а у микроорганизмов — 3,5–8,0 [2].

Целью работы является исследование эффективности применения фермента хитиназы в мясной отрасли. Для рубленых полуфабрикатов применялась хитиназа растительного происхождения из-за меньшего риска обсеменения. Дозировка составляла 10 мг на 1 г сырья, в течение часа хитиновый слой был разрушен. Таким образом, можно добавлять грибы во время посола мясного сырья, проходящего в течение 2–3 ч. Исследования показали, что рубленый полуфабрикат с добавкой из грибов имеет более мягкую консистенцию и текстуру.

После исследований была составлена рецептура нашего продукта, соответствующая требованиям ГОСТ-2019 [3]. На 100 кг основного сырья: 25 кг говядины 1-й категории жилованной, 50 кг свинины полужирной жилованной, 25 кг шпика бокового. На 100 кг дополнительного сырья: 2 кг поваренной соли, 100 г черного перца молотого, 50 г кардамона, 500 г шампиньонов, 5 г хитиназы. Данная рецептура удовлетворяет критериям органолептической оценки [3].

Литература

1. Гришин А. А., Зорина Н. В., Луцкий В. И. Хитин и хитозан: Химия, биологическая активность, применение // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2014. С. 1–6.
2. Журавлева Н. В., Лукьянов П. А. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2004. С. 76–86.
3. ГОСТ 23670-2019. Изделия колбасные вареные мясные. Технические условия: настоящий стандарт распространяется на мясные вареные колбасные изделия — вареные колбасы, сосиски, сардельки, шпикачки, колбасные хлебы, выпускаемые в охлажденном виде, предназначенные для непосредственного употребления в пищу и приготовления различных блюд и закусок: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 01.11.2019. № 115-П: дата введения 2019-01-30 / разработан «Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН. Москва: Стандартинформ, 2019. 7 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-56

**РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ РЕФОЛДИНГА Fc-СЛИТЫХ БЕЛКОВ,
ПОЛУЧАЕМЫХ В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ *ESCHERICHIA COLI*****DEVELOPMENT OF REFOLDING CONDITIONS FOR Fc-FUSED PROTEINS
OBTAINED IN THE *ESCHERICHIA COLI* EXPRESSION SYSTEM**

П. С. Астрелина, С. А. Ищук

R&D центр компании «Герофарм», Санкт-Петербург

P. S. Astrelina, S. A. Ishchuk

Geropharm R&D Center, Saint Petersburg

✉ Polina.Astrelina@geropharm.com

Аннотация

В работе описана процедура подбора условий рефолдинга для Fc-слитого белка с помощью статистического подхода DoE, рассмотрены факторы, влияющие на процесс, и предложены методы оценки пространственной структуры белка: SDS-PAGE и гель-фильтрационная хроматография.

Abstract

The study describes a procedure for selecting refolding conditions for Fc-fused protein using the statistical approach DoE (Design of Experiments), examines factors influencing the process, and proposes methods such as SDS-PAGE and gel filtration chromatography for assessing the correct protein structure.

Fc-слитые белки представляют собой химерные соединения, состоящие из биологически активного пептидного или рецепторного домена, слитого с фрагментом кристаллизуемого (Fc) домена антитела иммуноглобулина G (IgG). Данная конструкция позволяет продлить терапевтическую активность препарата, уменьшая период его полувыведения, а также снизить иммуногенность. Для производства белковых препаратов на основе платформы Fc-fusion наиболее широко используется бактериальная система экспрессии *Escherichia coli*. Вместе с тем существуют значительные недостатки в использовании прокариотов для производства эукариотических гетерологичных белков. Из-за отсутствия посттрансляционных модификаций и недостаточного уровня шаперонов происходит неправильное сворачивание полипептидной цепи, в результате чего образуются нерастворимые аморфные агрегаты, называемые тельцами включения. Это определяет необходимость введения дополнительных стадий очистки белков, таких как солиubilизация и рефолдинг.

В работе описана процедура подбора условий рефолдинга Fc-слитого белка с помощью статистического подхода DoE, выполнена оптимизация полученных результатов и рассмотрены методы оценки эффективности процесса ренатурации: SDS-PAGE и гель-фильтрационная хроматография.

На основании литературных данных в качестве наиболее значимых факторов для формирования правильной третичной структуры белка были рассмотрены соотношение концентраций окислительно-восстановительной пары (цистамин и цистеин) и pH буферной среды. Эти факторы были выбраны для дальнейшей разработки условий рефолдинга. Для создания статистической модели концентрации окислителя и восстановителя варьировали от 0,75 mM до 1,5 mM, pH среды — от 7,5 до 9. В качестве переменных отклика рассматривали параметры чистоты и выхода продукта по данным гель-фильтрационной хроматографии. Статистическая модель процесса была построена на основании 17 экспериментов с разными условиями рефолдинга, и выбраны значения факторов, обеспечивающих максимальный выход продукта. Оптимальные значения концентраций составили 0,88 mM и 1,36 mM для окислителя и восстановителя соответственно, pH среды — 9,2. В соответствии с полученными результатами была проведена ренатурация Fc-слитого белка в оптимальных условиях и проанализированы физико-химические показатели продукта. Известно, что образование дисульфидных связей между цистеиновыми остатками является критическим фактором для правильного пространственного сложения полипептидных цепей при их повторном сворачивании. Неправильно сфолдированные молекулы имеют склонность к образованию агрегатов [1], что было подтверждено методами гель-фильтрационной хроматографии и SDS-PAGE при нередуцирующих условиях. Выбранные параметры рефолдинга обеспечивают максимальный выход продукта. Этот подход может быть применен для производства разнообразных терапевтических препаратов на основе Fc-слитых белков.

Литература

1. Behrouz H. et al. Multivariate optimization of the refolding process of an incorrectly folded fc-fusion protein in a cell culture broth // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2020. Vol. 21. P. 226–235.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-57

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ *FUCUS VESICULOSUS****STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *FUCUS VESICULOSUS***

О. О. Бабич, Д. И. Мальков, С. А. Сухих

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

O. O. Babich, D. I. Malkov, S. A. Sukhikh

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

✉ stas-asp@mail.ru

Аннотация

В результате проведенных исследований определены антиоксидантные свойства фукоидана, выделенного из фукуса пузырчатого, собранного в Белом море. Антиоксидантная активность составила $0,136 \pm 0,010$ мг PGE/мл. *Fucus vesiculosus* Белого моря может быть безопасно использован в пищевой и фармацевтической промышленности как источник активных биохимических соединений с антиоксидантной активностью.

Abstract

This study determined the antioxidant properties of fucoidan isolated from *Fucus vesicularis* collected in the White Sea. The antioxidant activity was 0.136 ± 0.010 mg PGE/mL. White Sea *Fucus vesiculosus* can be used safely as a source of active biochemical compounds with antioxidant activity in the food and pharmaceutical industries.

Введение

Fucus vesiculosus широко используется в качестве биологически активной добавки к пище. *F. vesiculosus* является богатым источником полезных для здоровья соединений, таких как полисахариды (фукоиданы), простые сахара (глюкоза, фруктоза, рибоза, галактоза, манноза, рамноза, ксилоза и др.), полифенолы, полиненасыщенные и высокомолекулярные жирные кислоты, аминокислоты, фукоксантин и незаменимые минералы [1]. Фукоидан — это сульфатированный полисахарид, мономером которого чаще всего является фукоза. Структура и молекулярная масса фукоидана зависят от географического происхождения, сезона сбора, экстракции, вида, стадии роста и метода экстракции [1]. Фукоидан проявляет антикоагулянтную, анти-тромботическую и противоопухолевую активность. Однако антиоксидантная активность фукоидана изучена недостаточно [2].

Целью данной работы было изучение антиоксидантной способности полисахарида фукоидана, полученного из фукуса Белого моря.

Материалы и методы

Основным объектом исследования была бурая водоросль Белого моря *F. vesiculosus*. Пробы водорослей фукуса были взяты в период с октября по декабрь 2022 г. в Белом море. Процедура экстракции *F. vesiculosus* состояла в следующем: 20 г измельченных высушенных морских водорослей заливали 150 мл 85%-го этанола и механически перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Супернатант декантировали, водоросли переносили в центрифужную пробирку на 50 мл для центрифугирования с последующим удалением оставшегося супернатанта. Первый раз осадок промывали 150 мл этанола, второй — 150 мл ацетона, затем оставляли сушиться при комнатной температуре до постоянной массы [3].

Для определения антиоксидантной активности экстракта готовили 0,2 мл раствора DPPH в этаноле и добавляли 2 мл раствора DPPH к 2 мл тестируемых образцов.

Результаты

Антиоксидантные соединения играют важную роль — защиты от повреждений, вызванных активными формами кислорода, поскольку они ингибируют перекисное окисление липидов, удаляя свободные радикалы [4]. В настоящее время возрастает интерес к новым антиоксидантам из натуральных продуктов, поскольку они рас-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FZWM-2023-0003).

сматриваются как безопасные и эффективные терапевтические препараты против патологий, приводящих к окислительному повреждению [5].

В результате исследований установлено, что выход фукоидана из *F. vesiculosus* в пересчете на фукозу составил 43,36 мг/г с. в. При изучении антиоксидантных свойств фукозы (фукоидана), полученной из фукуса пузырчатого, в данной работе получено значение антиоксидантной активности $0,136 \pm 0,010$ мг PGE/мл.

Показано [6], что бурые макроводоросли (*Phaeophyceae*) обладают большим антиоксидантным потенциалом по сравнению с зелеными (*Chlorophyta*) и красными (*Rhodophyta*) классами. В некоторых обзорах опубликовано несколько биоактивных соединений, выделенных из бурых водорослей, большинство из которых относится к полифенольной и полисахаридной фракциям [3, 4].

Выводы

Таким образом, *F. vesiculosus* Белого моря может быть безопасно использован в качестве источника фукоидана с антиоксидантной активностью.

Литература

1. Cardoso S., Pereira O., Seca A. et al. Seaweeds as preventive agents for cardiovascular diseases: From nutrients to functional foods // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13. P. 6838–6865.
2. Nazarudin M. F., Isha A., Mastuki S. N. et al. Chemical Composition and Evaluation of the α -Glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Properties of Marine Algae *Ulva intestinalis*, *Halimeda macroloba*, and *Sargassum ilicifolium* // *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2020. P. 2753945. URL: <https://doi.org/10.1155/2020/2753945>.
3. Ptak S. H., Christensen K. V., Meichsner R., Frette X. Improving Fucooidan Yield from Fucus Brown Algae by Microwave Extraction // *Chemical engineering transactions*. 2019. Vol. 74.
4. Noel S. J., Jørgensen H. J. H., Knudsen K. E. B. Prediction of protein and amino acid composition and digestibility in individual feedstuffs and mixed diets for pigs using near-infrared spectroscopy // *Animal Nutrition*. 2021. Vol. 7 (4). P. 1242–1252. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.07.004>.
5. Baliyan S., Mukherjee R., Priyadarshini A. et al. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa* // *Molecules*. 2022. Vol. 27. P. 1326. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>.
6. Nunes N., Valente S., Ferraz S. et al. Validation of a spectrophotometric methodology for a rapid iodine analysis in algae and seaweed casts. // *Algal Research*. 2019. Vol. 42. P. 101613. URL: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101613>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-58

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ ОВЦЕБЫКА (*OVIPOS MOSCHATUS*) И ТАКИНА (*BUDORCAS TAXICOLOR*), ПОЛУЧЕННЫХ В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS***SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT MUSK OX (*OVIPOS MOSCHATUS*) AND TAKIN (*BUDORCAS TAXICOLOR*) CHYMOSINS OBTAINED IN THE EXPRESSION SYSTEM OF THE YEAST *KLUYVEROMYCES LACTIS***Е. А. Белаш¹, Д. В. Балабова¹, С. В. Беленькая², Д. Н. Щербаков^{1,2}, В. В. Ельчанинов³¹Алтайский государственный университет, Барнаул²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово³Федеральный Алтайский научный центр агробιοтехнологий,
Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, БарнаулE. A. Belash¹, D. V. Balabova¹, S. V. Belenkaya², D. N. Shcherbakov^{1,2}, V. V. Elchaninov³¹Altai State University, Barnaul²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo³Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Siberian Research Institute for Cheesemaking, Barnaul

✉ekaterina.belash1@gmail.com

Аннотация

В системе экспрессии *Kluyveromyces lactis* получены рекомбинантные химозины овцебыка и такина. По параметрам термостабильности, зависимости молокосвертывающей активности от pH и концентрации CaCl₂ в молоке, химозины походили на рекомбинантный химозин коровы, но отличались от рекомбинантного химозина одногорбого верблюда. Изученные свойства химозинов позволяют рассматривать их в качестве альтернативы коммерческим генно-инженерным коагулянтам.

Abstract

Recombinant chymosins of musk ox and takin were obtained in the expression system of yeast *Kluyveromyces lactis*. It was found that according to the parameters of thermal stability, the dependence of milk-clotting activity on pH and the concentration of CaCl₂ in milk, recombinant chymosins of takin and musk ox were similar to recombinant cow chymosin, but markedly different from recombinant chymosin of a single-humped camel. The studied biochemical properties of recombinant chymosins of takin and musk ox allow us to consider them as a potential alternative to modern commercial genetically engineered milk coagulants for cheesemaking.

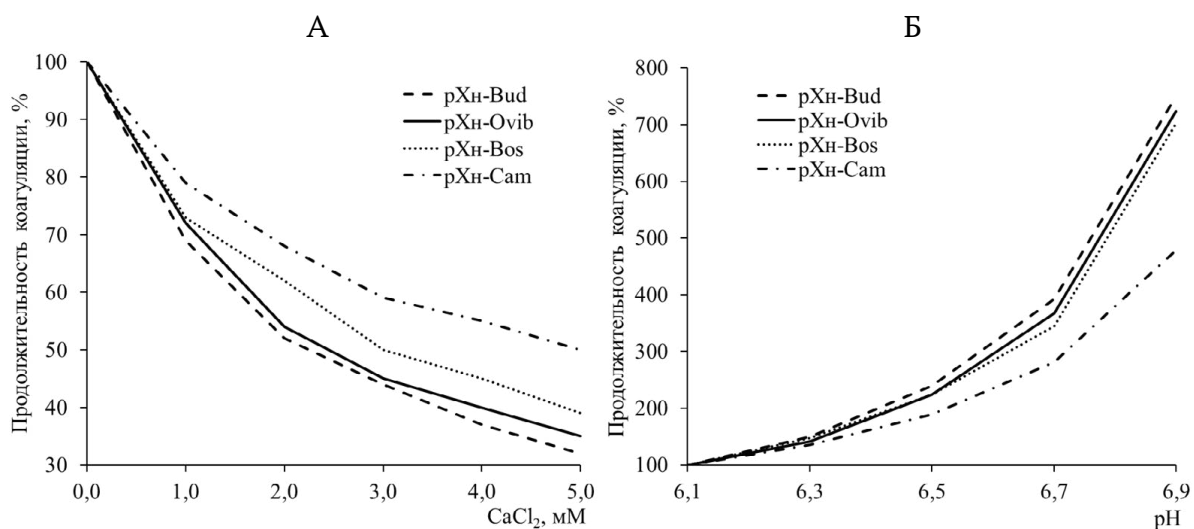
Производство сыров — динамично развивающаяся отрасль пищевой промышленности. Основным молокосвертывающим ферментом (МФ), используемым в сыроделии, является химозин. Химозин (Хн) — аспаргатовая эндопептидаза, которая гидролизует ключевую пептидную связь P105-M106 в молекуле каппа-казеина, что приводит к образованию молочного сгустка. Традиционно референсным коагулянтом молока считался Хн коровы (*Bos taurus*). В 2006 г. был получен рекомбинантный Хн (рХн) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*), который по ряду технологических параметров превзошел рХн коровы. Корова и одногорбый верблюд относятся к филогенетически отдаленным друг от друга семействам: Полорогие (Bovidae) и Верблюдовые (Camelidae). Пример рХн верблюда продемонстрировал возможность нахождения МФ, которые могут успешно конкурировать с рХн коровы. Поиск и исследование новых Хн является актуальной задачей современной биотехнологии [1].

Целью данной работы было определение некоторых биохимических свойств рХн представителей семейства Полорогие: овцебыка (*Ovibos moschatus*) и такина (*Budorcas taxicolor*), впервые полученных в системе продукции дрожжей *Kluyveromyces lactis*.

Молокосвертывающую активность (МА) и показатели термостабильности (ТС) определяли по методике [2], зависимость продолжительности коагуляции (ПК) от концентрации CaCl₂ и pH устанавливали в соответствии с [3]. Порогом термоинактивации считали T °C при которой рХн терял > 20 % от исходной МА. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие рХн коровы (рХн-Bos) и рХн верблюда (рХн-Cam) производства компании Chr. Hansen.

По чувствительности МА к изменению концентрации CaCl₂ рХн такина и овцебыка походили на традиционный эталон МФ — рХн коровы. В диапазоне 1–5 мМ CaCl₂ коагуляционная активность рХн-Ovib и рХн-Bud

была на 3–9 % и 9–16 % выше, чем у рХн коровы и рХн верблюда соответственно. Наименьшую чувствительность к нарастанию концентрации Ca^{2+} продемонстрировал рХн верблюда, наибольшую — рХн такина (см. рисунок, А).



Зависимость продолжительности коагуляции от pH (Б) и концентрации CaCl_2 в молоке (А)

При выработке сыров МФ вносится в молочную смесь при pH около 6,5, поэтому характер изменения МА вблизи этого значения является важным технологическим показателем. При повышении pH молока с 6,1 до 6,5 коагуляционная активность рХн коровы, овцебыка, такина и верблюда уменьшалась в 2,2; 2,4; 2,2 и 1,8 раза соответственно (см. рисунок, Б). Увеличение pH до 6,9 приводило к снижению МА рХн Полорогих в 7,0–7,5 раз, у рХн представителя Верблюдовых — в 4,8 раза. Таким образом, по способности коагулировать молоко в диапазоне pH 6,1–6,9 рХн-Ovib и рХн-Bud сопоставимы с рХн-Bos и по данному параметру соответствуют требованиям сыроделия.

Для выработки сыров необходимы коагулянты молока с умеренной ТС, как у Хн коровы. Идеальный МФ для сыроделия должен проявлять высокую МА при 32–33 °С, обеспечивая образование сгустка, и инактивироваться при $T > 40$ °С. Показатели ТС исследованных ферментов, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что по критерию низкой ТС рХн овцебыка и такина превосходят высококачественные коммерческие генно-инженерные коагулянты молока.

Термостабильность рекомбинантных химозинов

Препарат	Порог термоинактивации, °С	Температура инактивации, °С
рХн-Bos	52,5	60,0
рХн-Cam	56,0	65,0
рХн-Bud	42,0	55,0
рХн-Ovb	47,5	60,0

Обращают на себя внимание пороги термоинактивации рХн-Bud и рХн-Ovib, которые оказались на 5–10 °С ниже, чем у рХн-Bos, считающегося на сегодняшний день лучшим МФ по данному параметру.

Таким образом, изученные биохимические свойства рХн такина и овцебыка позволяют рассматривать эти ферменты в качестве потенциальной альтернативы современным коммерческим генно-инженерным МФ.

Литература

1. Ельчанинов В. В. Проблема поиска новых молокосвертывающих ферментов для сыроделия: критерии выбора источников генов для получения рекомбинантных химозинов. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2021. 170 с.
2. Balabova D. V., Belenkaya S. V., Volosnikova E. A. et al. Can Recombinant Tree Shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) Chymosin Coagulate Cow (*Bos taurus*) Milk? // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2022. Vol. 58, № 6. P. 763–772.
3. Balabova D. V., Rudometov A. P., Belenkaya S. V. et al. Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant // *Vavilov J. of Genetics and Breeding*. 2022. Vol. 26, № 3. P. 240–249.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-59

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХИЩНЫХ ГРИБОВ-ГИФОМИЦЕТОВ***ECOLOGICAL FEATURES OF PREDATORY FUNGI-NYRPHOMYCETES**

Т. Д. Белая

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

T. D. Belaya

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ belaya_td@vector.nsc.ru

Аннотация

Хищные грибы — это уникальные микроорганизмы, которые населяют практически всю планету Земля и являются природными регуляторами численности популяции нематод в почве. Однако несмотря на свое повсеместное распространение, они недостаточно изучены. В то же время данные, полученные в результате проведенных исследований, говорят о перспективе использования хищных грибов для борьбы с патогенными нематодами в сферах растениеводства и ветеринарии.

Abstract

Predatory fungi are unique microorganisms that inhabit almost the entire planet Earth and are natural regulators of the nematode population in the soil. But despite their ubiquity, they have not been studied fully enough. However, the data obtained as a result of the conducted studies indicate the prospect of using predatory fungi as a control against pathogenic nematodes in the field of crop production and veterinary medicine.

Во всем многообразии известных науке грибов хищные грибы, благодаря ряду особенностей, занимают особое место. Местом их обитания является почва, по данным большого числа исследований они обнаруживаются практически во всех уголках земного шара. Также они способны к жизнедеятельности в подавляющем большинстве климатических зон, включая даже зоны с экстремальными условиями, такие как Антарктида.

Главная биологическая и экологическая роль хищных грибов заключается в регуляции численности нематод. Эти животные освоили для обитания практически все виды почв. В них они выполняют различные роли, в том числе участвуют в почвообразовании. Однако, помимо этого, нематоды способны паразитировать на растениях и животных [1]. Кроме того, нематоды являются самой обширной группой беспозвоночных животных в пахотных землях, что может нести за собой определенную опасность для сельского хозяйства [2].

Установлено, что в почве хищные грибы существуют в виде хламидоспор. Они представляют собой эллипсоидные или округлые образования, окрашенные в темный цвет [3]. Такой вид существования очень удобен за счет наличия толстых стенок у хламидоспор, которые защищают содержимое споры от воздействия внешних факторов. Хищный гриб будет находиться в покоящейся стадии хламидоспоры до возникновения подходящих условий для роста. Одним из главных условий для роста является наличие в почве нематод. Как только рядом с покоящейся хламидоспорой появляется нематода, сразу запускается процесс роста мицелия и формирования ловчих приспособлений. Этот механизм широко используется при выделении штаммов хищных грибов из почвы в лабораторных условиях.

Благодаря наличию у хищных грибов нематофагового эффекта их стали изучать с целью применения в различных областях жизни для борьбы с нематодами. Первые исследования нематофаговой активности проводились в отношении фитонематод, начиная с 1937 г. [3, 4]. Т. В. Теплякова с соавт. разработали нематофаговый препарат на основе хищного гриба «Нематофагин» для борьбы с растительными нематодами [3, 5, 6]. Кроме этого, активно проводятся исследования противопаразитарного эффекта хищных грибов на животных. Широкое распространение за рубежом в качестве добавки к корму получил хищный гриб *Duddingtonia flagrans*. Хищные грибы показывают активность в отношении различных нематод, паразитирующих в пищеварительном тракте животных [7, 8]. Несмотря на то, что имеются обширные данные по хищным грибам и их активности против паразитических нематод, требуется их дальнейшее более глубокое изучение и поиск новых активных штаммов с целью сделать более четкой перспективу создания лекарственного противопаразитарного препарата на их основе.

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке, в рамках государственного задания Роспотребнадзора № ГЗ-29/21.

В результате проведенных работ, направленных на выделение хищных грибов из почвы, были обнаружены и выделены пять новых штаммов. Выделение проводили из почв Новосибирской области, Алтайского края, Республики Хакасия. На данный момент продолжаются исследования по идентификации полученных штаммов и изучению их нематофаговой активности на нематоде *Turbatrix aceti* (уксусная угрица).

Литература

1. Волкова Т. В., Казаченко И. П. Почвенные нематоды как компонент естественных и сельскохозяйственных ценозов в Приморском крае // Вестник ДВО РАН. 2014. № 3 (175). С. 34–38.
2. Соловьева Г. И. Экология почвенных нематод. Л.: Наука, 1986. 247 с.
3. Теплякова Т. В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов. Новосибирск. 1999. 252 с.
4. Мехтиева Н. А. Хищные грибы и возможность применения их в борьбе против фитонематод // Тез. докл. Всесоюз. конф. по с.-х. микробиол. Л. 1963. С. 69–70.
5. Патент № 2106092. Российская Федерация. Способ получения препарата хищных грибов для защиты растений и животных от паразитических нематод: № 93055853/13: заявл. 16.12.1993: опубл. 10.03.1998 / Т. В. Теплякова, В. Н. Зеленков.
6. Теплякова Т. В., Гущин Ф. Л., Бедин Д. П. Испытание препарата хищных грибов против галловой нематоды // Микробиологическая защита растений в Сибири. Новосибирск. 1982. № 17. С. 31–35.
7. Braga F. R., de Araújo J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals // Applied Microbiology and Biotechnology. 2014. Vol. 98. P. 71–82.
8. Кокколова Л. М., Гаврильева Л. Ю., Степанова С. М., Слепцова С. С. Нематофаговые грибы против личинок стронгилят лошадей // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2021. № 22. С. 261–269.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-60

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СОСУДИСТОГО РУСЛА ХОРИОАЛЛАНТОИСНОЙ
МЕМБРАНЫ КУРИНОГО ЭМБРИОНА В ОБЛАСТИ КОНТАКТА С ПОЛИМЕРНЫМ МАТЕРИАЛОМ,
СОДЕРЖАЩИМ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, В УСЛОВИЯХ
ДЕЙСТВИЯ СТАТИЧЕСКОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ УМЕРЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ***

**VASCULAR BED FORMATION FEATURES OF THE CHICK EMBRYO CHORIOALLANTOIC
MEMBRANE IN THE AREA OF CONTACT WITH A POLYMERIC MATERIAL CONTAINING
SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES UNDER THE INFLUENCE OF STATIC
MAGNETIC FIELD OF MODERATE INTENSITY**

Н. С. Босенко, Е. В. Зубарева, А. Е. Ким, С. Б. Курашев

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

N. S. Bosenko, E. V. Zubareva, A. E. Kim, S. B. Kurashev

Belgorod State National Research University

✉ zubareva@bsu.edu.ru

Аннотация

В работе исследованы особенности неоваскулогенеза на модели хориоаллантаоисной мембраны куриного эмбриона в условиях действия статического магнитного поля (СМП) в присутствии хитозановых волокон с суперпарамагнитными наночастицами Fe_3O_4 . Было выявлено, что совокупное воздействие СМП умеренной интенсивности и волокон из хитозана с суперпарамагнитными наночастицами оксида железа приводило к увеличению плотности сосудов (VD) и плотности длины сосудов (VLD).

Abstract

In this work, we studied the features of neovasculogenesis on the chick embryo chorioallantioic membrane model under the static magnetic field (SMF) influence in the presence of chitosan fibers with superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles. It was found that the combined effect of moderate-intensity SMF and chitosan fibers with iron oxide superparamagnetic nanoparticles led to an increase in vessel density (VD) and vessel length density (VLD).

Воздействие статического магнитного поля (СМП) на биологические системы в последние годы стало предметом повышенного интереса. Известно о существенном влиянии СМП на регуляцию клеточных ответов, однако предсказуемость эффектов варьирует в зависимости от исследуемой биологической системы [1, 2]. Актуальным является изучение совокупного воздействия СМП и полимерных материалов, имеющих в составе суперпарамагнитные наночастицы, на процессы васкуляризации.

Цель работы — изучение особенностей неоваскулогенеза на модели хориоаллантаоисной мембраны (ХАМ) куриного эмбриона в условиях действия СМП в присутствии хитозановых волокон, содержащих суперпарамагнитные наночастицы оксида железа.

Для оценки формирования сосудистой сети оплодотворенные куриные яйца инкубировали в течение 72 ч. Затем в скорлупе яиц контрольной и экспериментальной групп создавали отверстие. В экспериментальной группе на поверхность ХАМ имплантировали хитозановые волокна, изготовленные методом мокрого прядения, имеющие в своем составе суперпарамагнитные наночастицы оксида железа Fe_3O_4 [3]. Отверстие в обеих группах запечатывали пленкой и инкубировали в течение 144 ч. Яйца с имплантированными волокнами подвергали воздействию статического магнитного поля умеренной интенсивности (80 мТл). По истечении времени инкубации с помощью стереомикроскопа получали изображения ХАМ. Оценку формирования сосудистой сети в непосредственной близости (до 3 см) от волокна проводили с помощью ПО ImageJ с установленным плагином Vessel Analysis, получали значения плотности сосудов (Vascular Density, VD) и плотности длины сосудов (Vascular Length Density, VLD).

Выявлено, что совокупное влияние статического магнитного поля умеренной интенсивности (80 мТл) и волокон из хитозана с суперпарамагнитными наночастицами оксида железа сопровождалось увеличением значений показателей, характеризующих плотность сосудов (VD), на 9,5 %, а плотность длины сосудов (VLD) — на 35,7 %, в сравнении со значениями соответствующих показателей контрольной группы ($p < 0,05$).

* Работа выполнена при поддержке гранта УМНИК, договор № 16526ГУ/2021.

© Н. С. Босенко, Е. В. Зубарева, А. Е. Ким, С. Б. Курашев, 2023

Полученные данные могут свидетельствовать об эффекте стимуляции процессов формирования сосудистой сети совокупным воздействием волокон из хитозана, содержащих суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, и статического магнитного поля умеренной интенсивности (80 мТл).

Литература

1. Albuquerque W. W. C., Costa R. M. P. B., Fernandes T. de S. E., Porto A. L. F. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2016. Vol. 121 (1). P. 16–28.
2. D'Amora U., Russo T., Gloria A. et al. 3D additive-manufactured nanocomposite magnetic scaffolds: Effect of the application mode of a time-dependent magnetic field on hMSCs behavior // *Bioactive Materials*. 2017. Vol. 2 (3). P. 138–145.
3. Brüggemann D., Michel J., Suter N. et al. Wet-spinning of magneto-responsive helical chitosan microfibers // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2020. Vol. 11. P. 991–999.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-61

**КОЭКСПРЕССИЯ *VITREOSCILLA* НАЕМОГЛОБИН В *E. COLI*
ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММА К НИЗКОМУ СОДЕРЖАНИЮ КИСЛОРОДА
В ПРОЦЕССЕ ВЫСОКОПЛОТНОСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**CO-EXPRESSION OF *VITREOSCILLA* HAEMOGLOBIN IN *E. COLI* TO INCREASE STRAIN
RESISTANCE TO LOW OXYGEN CONTENT DURING HIGH-DENSITY CULTIVATION**

М. Д. Бочкарева, Д. А. Гречко, Н. К. Казанова, З. Р. Хасаншина, В. Ф. Латыпов

ЗАО «Фарм-Холдинг» (R&D центр компании «Герофарм»), Санкт-Петербург

M. D. Bochkareva, D. A. Grechko, N. K. Kazanova, Z. R. Khasanshina, V. F. Latypov

Pharm-Holding, CJSC (Geropharm R&D Center), Saint Petersburg

✉ mariia.bochkareva@geropharm.com

Аннотация

Одним из способов повышения продуктивности штаммов-продуцентов является увеличение их толерантности к недостатку кислорода, который возникает в процессе высокоплотностного культивирования в промышленных биореакторах. В рамках данной работы увеличена толерантность клеток к недостатку pO_2 путем коэкспрессии Vhb, что позволило увеличить окислительную активность клеток и удельную продуктивность штамма при культивировании в биореакторах.

Abstract

One way to increase the productivity of producer strains is to increase their tolerance to oxygen deficiency, which occurs during high-density cultivation in industrial bioreactors. In this work, the tolerance of cells to oxygen deficiency was increased by Vhb co-expression, which made it possible to increase oxidative activity of cells and specific productivity of the strain during cultivation in bioreactors.

Для закрытия потребностей рынка в биотехнологических продуктах необходимо повышение эффективности наработки белков в микробиологических системах. Одним из способов повышения продуктивности является увеличение толерантности штаммов-продуцентов к недостатку кислорода, который возникает при высокоплотностном культивировании в промышленных биореакторах.

Как правило, для увеличения скорости роста *E. Coli* в биореакторах подается избыток субстрата для окисления, что приводит к неполному окислению субстрата и образованию токсичных для клеток вторичных метаболитов, которые замедляют дальнейшее увеличение биомассы и продуктивности. В данной работе толерантность клеток к недостатку кислорода была увеличена путем коэкспрессии гемоглобина Hb *Vitreoscilla* из генома *E. Coli*, что позволило увеличить окислительную активность клеток и увеличить удельную продуктивность.

Цели данной работы — получение генетически модифицированного штамма *E. Coli*, коэкспрессирующего гемоглобин Hb *Vitreoscilla*, для снижения образования токсичных метаболитов в процессе культивирования и увеличения объемной продуктивности штамма; разработка процесса культивирования в биореакторах; оценка итоговых характеристик штамма в оптимизированных для него условиях.

Получение штамма

Проведен дизайн генетических конструкций для интеграции гена VHB под промоторами VHB и TacT7 в геномную ДНК штамма *E. Coli*. Получены конструкции, содержащие ген устойчивости к тетрациклину, фланкированный сайтами узнавания FLP-рекомбиназы, разные промоторы — Vhb или Tac, ген Vhb и последовательности, комплементарные бактериальной ДНК для направленной интеграции в геном. Создан генетически-модифицированный штамм с дополнительной экспрессией гена Vhb, кодирующего гемоглобин *Vitreoscilla*. Проведена стабилизация клонов штамма с помощью проведения пассажей под селективным давлением антибиотика и повышенного содержания CO_2 в атмосфере, что создавало селективирующее давление при наличии гена Vhb под контролем индуцибельного промотора Vhb.

Проведен подбор стартовых условий культивирования (температуры и pH) и условий индукции (OD индукции и концентрация IPTG) в колбах с использованием подхода Design of Experiments. По полученным откликам системы (биомасса, количество продуцируемого белка) построены модели и определены рабочие диапазоны факторов для дальнейшей валидации в биореакторах.

Проведено масштабирование выбранных диапазонов факторов в скрининговых биореакторах с рабочим объемом 600 мл, проведен подбор условий культивирования и индукции экспрессии гибридного белка в скрининговых биореакторах.

Результаты

Снижена потребность *E. Coli* в растворенном в среде кислороде в процессе высокоплотного культивирования: после автоиндукции Vhb не происходит снижения концентрации растворенного кислорода в среде от точки установки, в отличие от исходного штамма, у которого наблюдается полное поглощение кислорода клетками до 0 %.

Удельная продуктивность штамма увеличена на 62 %. Наблюдалось отрицательное влияние на накопление биомассы (уменьшение на 25 %), что привело к уменьшению объемной продуктивности.

Выводы

Аэробная экспрессия VНb может считаться потенциальным инструментом для улучшения характеристик промышленных штаммов-продуцентов: успешно снижена потребность клеток в растворенном в среде кислороде, что критически важно в процессе высокоплотного культивирования.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-62

**СОЗДАНИЕ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА СУРФАКТИНА
В ГЕНОМЕ БАКТЕРИИ *BACILLUS SUBTILIS****

**CREATION OF A VECTOR CONSTRUCT FOR THE INACTIVATION OF THE SURFACTIN GENE
IN THE GENOME OF THE BACTERIUM *BACILLUS SUBTILIS***

Ю. А. Васильева, А. И. Гильмутдинова, Д. И. Хасанов, Ю. В. Данилова, Н. Л. Рудакова, М. Р. Шарипова

Казанский федеральный университет

Yu. A. Vasileva, A. I. Gilmutdinova, D. I. Khasanov, Yu. V. Danilova, N. L. Rudakova, M. R. Sharipova

Kazan Federal University

✉ vasileva891@mail.ru

Аннотация

Данное исследование направлено на инактивацию генов *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* методом направленного редактирования CRISPR/Cas9 в штамм *Bacillus subtilis* sp. для изучения вклада сурфактина в борьбу с болезнями растений.

Abstract

This study aims to inactivate genes *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* by CRISPR/Cas9 directed editing in *Bacillus subtilis* sp. to investigate the contribution of surfactin in plant disease control mechanism.

Представители рода *Bacillus* обладают сильной антагонистической активностью против различных патогенов растений и часто используются в качестве агентов биологического контроля [1]. Индуцируя механизмы системной резистентности растений, продуцируя ряд антимикробных веществ и внеклеточные ферменты, они успешно конкурируют за питание и экологические ниши в ризосфере. Именно к таким антимикробным веществам относится циклический липопептид сурфактин, обладающий хорошими антибактериальными, противогрибковыми и противовирусными свойствами [2].

Bacillus subtilis sp., выделенный из ризосферы картофеля, проявляет высокую антагонистическую активность против важнейших патогенов растений рода *Fusarium*. Благодаря своим фунгицидным свойствам широкого спектра действия *B. subtilis* sp. является актуальным кандидатом в качестве агента биологического контроля [3].

Целью данной работы являлось создание векторной конструкции на основе технологии CRISPR/Cas9 для дальнейшей инактивации гена сурфактина в геноме бактерии *Bacillus subtilis*.

Для инактивации трех генов мишеней в работе использовался шаттл-вектор pJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9 [4]. Путем гибридизации праймеров был получен спейсерный фрагмент (sgRNA), который интегрировали в вектор по сайту рестрикции BsaI. С геномной ДНК *B. subtilis* sp. были амплифицированы фрагменты гена сурфактина, которые встраивали в плазмиду pJOE9282.1 по сайту SfiI. Полученную конструкцию pVYs07.23 трансформировали в клетки *E. coli* DH5a для дальнейшего клонирования. Целостность созданного вектора подтверждали секвенированием. Таким образом, нами была создана и клонирована векторная конструкция pVYs07.23. В дальнейшем планируется инактивация трех генов, ответственных за синтез сурфактина в геноме штамма *B. subtilis* sp.

Литература

1. Bóka B., Manczinger L., Kocsubé S. et al. Genome analysis of a *Bacillus subtilis* strain reveals genetic mutations determining biocontrol properties // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 35 (52). P. 1–14.
2. Zhen C., Ge X.F., Lu Y.T., Liu W.Z. Chemical structure, properties and potential applications of surfactin, as well as advanced strategies for improving its microbial production // *AIMS microbiology*. 2023. Vol. 9 (2). P. 195–217.
3. Mardanova A.M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T. et al. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi // *Agricultural Sciences*. 2016. Vol. 8 (1). P. 1–20.
4. Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system // *Applied and environmental microbiology*. 2016. Vol. 8 (17). P. 5421–5427.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-16-00138.

© Ю. А. Васильева, А. И. Гильмутдинова, Д. И. Хасанов, Ю. В. Данилова, Н. Л. Рудакова, М. Р. Шарипова, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-63

РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ДОБАВОК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ АТЕРОСКЛЕРОЗА*

DEVELOPMENT OF PROBIOTIC SUPPLEMENTS FOR THE PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS

А. Д. Веснина, А. Ю. Просеков

Кемеровский государственный университет

A. D. Vesnina, A. Yu. Prosekov

Kemerovo State University

✉ koledockop1@mail.ru

Аннотация

Правильное (рациональное, сбалансированное) питание является относительно простым, доступным профилактическим средством. Благодаря современному развитию науки и техники понятие «правильное питание» включает в себя персонализированный подход, т. е. может формироваться с учетом индивидуальных особенностей потребителя. Данная работа направлена на разработку состава индивидуально подобранных функциональных пищевых добавок на основе пробиотиков.

Abstract

Proper (rational, balanced) nutrition is a relatively simple, affordable preventive measure. Thanks to the modern development of science and technology, the concept of “proper nutrition” includes a personalized approach, i. e. can be formed taking into account the individual characteristics of the consumer. This work is aimed at developing the composition of individually selected functional food supplements based on probiotics.

Микробиота желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) — сообщество микроорганизмов ЖКТ, регулирующее функционирование организма-хозяина (иммунную, эндокринную и прочие системы). Известно, что нарушение работы микробиоты ЖКТ является одной из причин возникновения патогенеза атеросклероза [1]. Акцент на атеросклероз обусловлен тем, что данное хроническое воспалительное заболевание является первопричиной развития ишемической болезни сердца, инсульта, инфаркта миокарда и прочих сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), являющихся наиболее распространенными причинами смерти [2]. В связи с этим актуальны мероприятия, направленные на профилактику атеросклероза через нормализацию работы микробиоты ЖКТ. Значительный интерес вызывают пробиотики и пребиотики, входящие в состав различных функциональных пищевых добавок (ФПД), способные модулировать состав микробиоты ЖКТ.

В данной работе объектами исследования являлись пробиотические консорциумы (ПК): № 1. *L. acidophilus* В-3190 + *L. plantarum* В-11007 + *B. animalis* АС-1560; № 2. *L. plantarum* В-11007 + *L. fermentum* В-7574 + *B. bifidum* АС-1579 + *B. animalis* АС-1560; № 3. *L. fermentum* В-7574 + *L. plantarum* В-11007 + *B. animalis* АС-1560. Оценка биофункциональных свойств штаммов, входящих в данные ПК, осуществлялась ранее, что отражено в публикации авторов [3].

Биофункциональные свойства ПК оценивали по антимикробной и антиоксидантной активности, антибиотикоустойчивости [4] и способности снижать уровень холестерина в питательных средах [5]. В рамках персонализации рассматривали биосовместимость ПК по отношению к культивируемым представителям нормальной микробиоты ЖКТ (*Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Streptococcus salivarius*, *S. agalactiae*, *S. thermophilus*), выделенным из фекалий добровольцев, участвующих в данном исследовании. Методика выделения представителей нормальной микробиоты ЖКТ из фекалий представлена в работе авторов [6], идентификация осуществлялась по МУ 2.3.2.2789-10. Добровольцы являлись пациентами Кузбасского клинического кардиологического диспансера им. акад. Л. С. Барбараша (г. Кемерово), у которых имелись факторы риска развития атеросклероза, но не было диагностировано данное заболевание. Результаты по оценке биоактивности ПК отражены в таблице.

Установлено, что для добровольцев, которым необходимо снижать уровень холестерина и у которых высокие риски окислительного стресса, предположительно необходим систематический прием ПК № 1. В состав ПК будут входить штаммы в количестве от адекватного до верхнего допустимого уровня потребления (МР 2.3.1.1915-04). В перспективе предполагается формирование на основе ПК № 1 синбиотической добавки, с варьированием

* Работа выполнена в рамках государственного задания № FZSR-2023-0002.

© А. Д. Веснина, А. Ю. Просеков, 2023

качества и количества пребиотика и прочих веществ, проявляющих способность модулировать микробиоту ЖКТ и проявлять антиатеросклеротический потенциал.

Биоактивность разработанных консорциумов

ПК	Антимикробная активность					Антибиотикоустойчивость					Уровень холестерина, % от контроля	АОА на 7 ч культивирования, %
	Диаметр зон подавления роста, мм											
	<i>E. coli</i> В-6645	<i>B. subtilis</i> В-110	<i>C. albicans</i> У-3108	<i>K. pneumoniae</i> К1 5054	<i>Ps. aeruginosa</i> В-6643	Стрептомицин	Тетрациклин	Ампициллин	Гентамицин	Хлорамфеникол		
№ 1	27,3 ± 1,3	30,1 ± 1,1	29,8 ± 1,0	11,5 ± 0,9	28,3 ± 1,2	12,2 ± 1,1	15,6 ± 1,2	7,1 ± 0,9	11,3 ± 1,2	17,2 ± 1,3	18,0 ± 0,5	40,1 ± 1,5
№ 2	28,7 ± 2,2	29,7 ± 1,0	30,7 ± 1,2	11,7 ± 0,2	28,1 ± 2,2	11,9 ± 1,2	12,9 ± 1,2	17,1 ± 1,2	14,2 ± 1,2	20,5 ± 1,9	17,3 ± 0,3	39,5 ± 1,6
№ 3	28,2 ± 1,1	29,9 ± 1,0	30,1 ± 0,9	15,2 ± 1,4	29,1 ± 1,0	15,3 ± 1,0	16,5 ± 1,3	17,3 ± 1,4	11,5 ± 1,0	17,7 ± 1,1	14,8 ± 0,1	39,5 ± 1,6
Биосовместимость												
(«+» — биосовместимы; «-» — бионесовместимы; «±» — слабый антагонизм; «-+» — сильный антагонизм)												
ПК	<i>Bifidobacterium</i> (<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>)				<i>Lactobacillus</i> (<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>)			<i>Streptococcus</i> (<i>S. salivarius</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. thermophilus</i>)				
№ 1	+				+			+				
№ 2	+				+			+				
№ 3	+				+			+				

Литература

- Meslier V., Laiola M., Roager H.M. et al. Mediterranean diet intervention in overweight and obese subjects lowers plasma cholesterol and causes changes in the gut microbiome and metabolome independently of energy intake // *Gut*. 2020. Vol. 69 (7). P. 1258–1268. URL: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320438>.
- Wang Y., Yin L., Hu B. et al. Association of heart rate with cardiovascular events and mortality in hypertensive and normotensive population: a nationwide prospective cohort study // *Annals of translational medicine*. 2021. Vol. 9 (11). P. 917. URL: <https://doi.org/10.21037/atm-21-706>.
- Веснина А. Д., Чаплыгина О. С., Просеков А. Ю. Персонализированное питание для профилактики атеросклероза (роль микробиоты ЖКТ) // *Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий: сб. материалов I Междунар. конгресса, Кемерово, 28–30 ноября 2022 г. Кемерово: Кемеровский гос. ун-т, 2022. С. 76–79. URL: <https://doi.org/10.21603/I-IC-23>.*
- Lee D.K., Jang S., Baek E.H. et al. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content // *Lipids in health and disease*. 2009. Vol. 8. P. 21. URL: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-8-21>.
- Веснина А. Д., Просеков А. Ю., Козлова О. В. и др. Разработка пробиотического консорциума для людей с онкологическими заболеваниями // *Вестник ВГУИТ*. 2021. Т. 83, № 1 (87). С. 219–232. URL: <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2021-1-219-232>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-64

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ПУУМАЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO НА МИКРОНОСИТЕЛЯХ**PUUMALA VIRUS CULTIVATION IN VERO CELL CULTURE ON MICROCARRIERS**

А. Н. Ветрова^{1,2}, С. С. Курашова¹, М. С. Егорова¹, Р. Д. Теодорович¹, Ж. Х. Мажед¹,
Ю. Ю. Ивин¹, А. А. Ишмухаметов^{1,2}, Е. А. Ткаченко¹, Т. К. Дзагурова¹

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

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

A. N. Vetrova^{1,2}, S. S. Kurashova¹, M. S. Egorova¹, R. D. Teodorovich¹, Z. K. Mazhed¹,
Yu. Yu. Ivin¹, A. A. Ishmukhametov^{1,2}, E. A. Tkachenko¹, T. K. Dzagurova¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

²Sechenov First Moscow State Medical University

✉ ann.vetr.99@mail.ru

Аннотация

Для хантавируса Пуумала была отработана методика культивирования в клетках Vero на микроносителе в небольших объемах псевдосуспензии. Полученные результаты демонстрируют эффективность данного метода культивирования по количеству собранного вирусного материала и затраченных усилий и послужат отправной точкой для дальнейшего масштабирования процесса производства культуральной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом с использованием биореакторной технологии.

Abstract

We worked out a method of hantavirus Puumala cultivation in Vero cells on a micro-carrier in small volumes of pseudosuspension. The results obtained demonstrate the effectiveness of this cultivation method in terms of the amount of viral harvest and the effort expended and will serve as a starting point for further scale-up of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in the bioreactor.

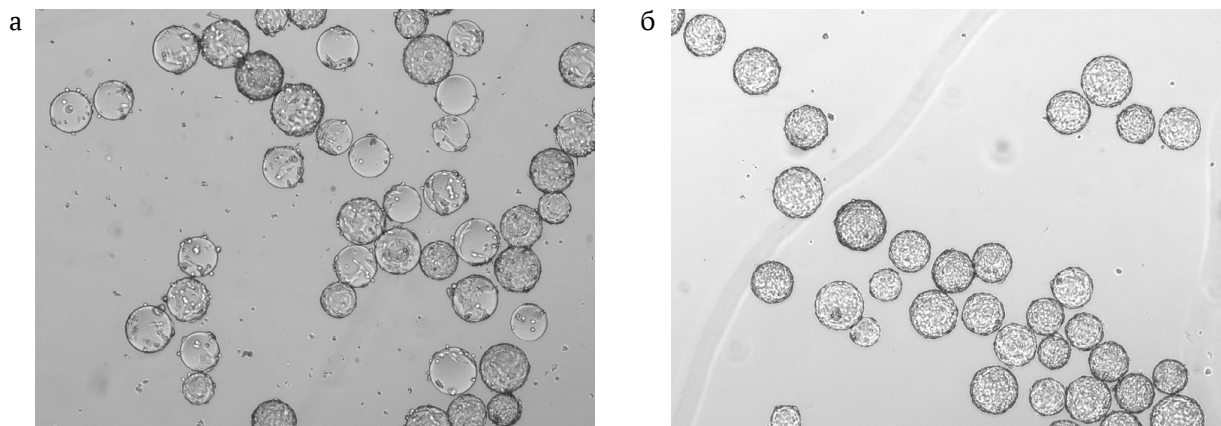
Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает в РФ ведущее место среди природно-очаговых инфекций. Оптимизация технологического процесса производства вакцины остается актуальной задачей. В данном исследовании рассмотрен метод культивирования культуры клеток Vero, инфицированной вирусом Пуумала, на микроносителях в объеме псевдосуспензии менее 1 л. Целью исследования являлось определение зависимости кинетики процесса накопления инфекционных вирусных частиц вируса Пуумала в культуральной жидкости от способа культивирования.

Материалы и методы

Для сравнения с ранее применяемой методикой сбора культуральной жидкости [1], содержащей вирус Пуумала, использовали микроноситель LXMC-dex1 (Sunresin) в количестве 3 грамма на 1 литр среды культивирования. Предварительно микроноситель промывали в растворе PBS и стерилизовали автоклавированием. Для заражения клеточной взвеси Vero использовали культуральную жидкость, содержащую вирус Пуумала, штамм ТКД/УФА-97 с титром $5 \pm 0,5$ lg ФОЕ/мл. В спиннерную колбу (BELLCO) вносили подготовленный микроноситель, взвесь клеток Vero, вирус Пуумала и питательную среду для культивирования (ИГЛА ДМЕМ (ФГАНУ «ФН-ЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)) с 5%-й телячьей сывороткой (Cytiva HyClone™). Спиннерную колбу устанавливали на магнитную мешалку и инкубировали при температуре 37 ± 1 °C в течение 5 ч, включая режим перемешивания на 5-7 мин каждый час для лучшего прикрепления клеток к поверхности микроносителя. После этапа заражения дальнейшее культивирование проводили при постоянном перемешивании. Смену среды в спиннерной колбе проводили раз в сутки питательной средой (ИГЛА МЕМ (Институт полиомиелита)) без добавления телячьей сыворотки. Контроль прикрепления клеток к микроносителю и состояния клеток в процессе их роста осуществлялся ежедневно путем микроскопии образцов суспензии (см. рисунок). Выход

вируса Пуумала в культуральную жидкость оценивали по титру вируса в lg методом фокусобразующих единиц (ФОЕ/мл) и по содержанию вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РВ-ПЦР) со штаммоспецифичными праймерами. Образцы культуральной жидкости отбирались один раз в сутки, начиная с третьих. Эксперимент повторили 6 раз. Все данные были проанализированы в программе GraphPad Prism версии 8.2.0.



Микроскопия клеток Vero, культивируемых на микроносителе LXMC-dex1: а — 3-и сутки, б — 9-е сутки

Результаты

После проведенного заражения клетки образовывали на гранулах микроносителя полный монослой к 3-м суткам. При дальнейшем культивировании монослой сохранялся неизменным, клетки не теряли адгезивности к микроносителю до 20-х суток наблюдения. Цитотоксического эффекта не наблюдали. Сбор культуральной жидкости продолжали до начала деградации клеточного монослоя на микроносителях — на 17–19-е сутки.

Нарастание титра вируса наблюдали с 3-х суток. Максимальное нарастание титра вируса Пуумала отмечалось на 9-е сутки и соответствовало $6 \pm 0,25$ lg ФОЕ/мл. Оптимальным титром вируса для сбора культуральной жидкости принято считать $\geq 5 \pm 0,2$ lg ФОЕ/мл, 1×10^5 копий вирусной РНК/мл. Таким образом, оптимальным интервалом для сбора культуральной жидкости являются 5–15-е сутки, при минимальной множественности заражения (MOI) = 0,2. Объем собранной вирусосодержащей жидкости за один раз составлял 500 мл. Суммарный объем собранного за одно культивирование вирусного материала в спиннерной колбе — 5000 мл. Для получения того же объема вирусосодержащей культуральной жидкости понадобится не менее 10 роллерных бутылей.

Заключение

Практическим выходом данной работы является возможность культивирования ортохантавирусов в клетках Vero на микроносителях, что позволяет увеличивать выход собираемого вирусного материала при минимизации временных и трудовых затрат. В результате проведенного эксперимента была отработана методика культивирования вируса Пуумала в культуре клеток Vero на микроносителе LXMC-dex1 и показана зависимость процесса нарастания титра вируса и количества копий вирусной РНК/мл от времени. Полученные результаты являются промежуточным этапом масштабирования процесса культивирования вируса в биореакторах.

Литература

1. Ткаченко Е. А., Ишмухаметов А. А., Дзагурова Т. К. и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2015. № 6. С. 47–54.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-65

**ТЕХНОЛОГИЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ****TECHNOLOGY OF ENCAPSULATION OF PROBIOTIC MICROORGANISMS
FOR THE PRODUCTION OF FUNCTIONAL FOODS**А. Р. Галимова^{1,2}, М. С. Каночкина²¹*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*²*Российский биотехнологический университет, Москва*A. R. Galimova^{1,2}, M. S. Kanochkina²¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow*²*Russian Biotechnological University, Moscow*✉ alinkamx79@gmail.com**Аннотация**

Проведен анализ технологий инкапсулирования пробиотических микроорганизмов биополимерами на основе альгината натрия. Такое микрокапсулирование необходимо для защиты пробиотиков в процессе технологической обработки, хранения и целевой доставки до отдела толстого кишечника.

Abstract

An analysis of technologies for encapsulating probiotic microorganisms with biopolymers based on sodium alginate was carried out. Such microencapsulation is necessary to protect probiotics during processing, storage, and their targeted delivery to the colon.

В настоящее время все больше внимания уделяется значению питания для здоровья населения. В связи с этим разрабатываются функциональные продукты, которые позволяют снизить риск возникновения алиментарно-зависимых заболеваний путем внесения физиологически функциональных нутриентов. Среди таких нутриентов можно выделить пробиотические микроорганизмы.

Пробиотические микроорганизмы — живые непатогенные и нетоксигенные микроорганизмы, представители защитных групп нормального кишечного микробиоценоза здорового человека, поступающие в составе пищевой продукции для улучшения (оптимизации) состава и биологической активности защитной микрофлоры кишечника человека [1]. Содержание пробиотических микроорганизмов в составе функциональных пищевых продуктов должно составлять не менее 10^6 колониеобразующих единиц в 1 г или 1 cm^3 такой продукции [2].

Прием пробиотиков моделирует микробиоценоз желудочно-кишечного тракта, что приводит к улучшению микробиома кишечника. Пробиотики могут усиливать барьерную функцию кишечника, регулировать иммунную функцию, подавлять рост патогенов и поддерживать баланс кишечной флоры, тем самым предотвращая кишечные заболевания. Также они синтезируют витамины и нейромедиаторы.

Однако пробиотики — это живые микроорганизмы, которые могут быть повреждены или уничтожены экстремальными условиями, во время приготовления и хранения (механические силы, высокие температуры) или во время прохождения через ЖКТ (желудочные и желчные кислоты). Жизнеспособность пробиотиков можно повысить, инкапсулировав их в подходящие системы доставки.

Цель исследования — анализ технологий микрокапсулирования пробиотических микроорганизмов биополимерами, позволяющими повысить их сохранность и реализовать таргетную доставку до целевого отдела кишечника.

Микрокапсулирование — широко применяемый метод для доставки пробиотиков. Чаще для этих целей используют природные полимеры: каррагинан, альгинат, пектин, производные крахмала. Альгинат привлекает внимание физико-химическими и механическими свойствами: простая структура, доступное сырье, низкая токсичность, легкая обработка и простота образования геля.

Альгинат натрия — линейный гидрофильный полисахарид, полученный из бурых водорослей, состоящий из двух моносахаридных звеньев. Альгинат натрия обычно используется для приготовления съедобных покрытий по причине высокой биоразлагаемости, биосовместимости и низкой токсичности [3]. Альгинат является хорошим носителем, но имеет недостатки. Альгинатные микрогранулы плохо защищают пробиотики в условиях

низкого pH по сравнению с микрокапсулами с двойным покрытием (альгинат — хитозан). Пористость альгинатного геля увеличивается при наличии некоторых бактерий и изменяется при увеличении концентрации H^+ , что приводит к ограничению пробиотической защиты.

Альгинат натрия — хитозан. Хитозан представляет собой катионный полисахарид с положительным зарядом и может образовывать составной электролитный гель с анионным альгинатом натрия. Микрокапсула состоит из двух слоев: хитозан (положительно заряженный) и альгинат (отрицательно заряженный). Благодаря хорошим свойствам набухания бислоем может способствовать проникновению стимуляторов и обеспечивать хорошую защиту клеток [3]. Альгинат натрия и хитозан являются мукоадгезивными и могут прилипать к слизи, продлевая время удерживания, тем самым способствуя колонизации пробиотиков в кишечнике [4].

Заключение

Микрокапсулирование улучшает сохранность пробиотиков при переработке, транспортировке и хранении. Функциональные продукты с высокой активностью пробиотиков и антиоксидантной способностью могут быть получены из пробиотиков, микрокапсулированных альгинатом.

Гидрогели альгинат — хитозан обеспечивают доставку пробиотиков с контролируемым высвобождением в толстом кишечнике, поскольку они стабильно существуют в сильноокислой среде желудка, но нестабильны в слабнокислой среде кишечника.

Литература

1. ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (с изменениями на 14.07.2021 г.).
2. ГОСТ 55577-2013. Продукты пищевые функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии 06.09.2013 г. № 852-ст.
3. Wang X., Gao S., Yun S. Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application // *Pharmaceuticals* (Basel). 2022. DOI: 10.3390/ph15050644.
4. Anselmo A. C., McHugh K. J., Webster J. Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome // *Adv. Mater.* 2016. DOI: 10.1002/adma.201603270.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-66

**ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА NKG2D CART-КЛЕТОК
ПРОТИВ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ
ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ЛИГАНДЫ NKG2D***

**EVALUATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF NKG2D CART CELLS AGAINST CELLS OF AN
EPITHELIAL TUMOR CELL LINE OVEREXPRESSING NKG2D LIGANDS**

И. А. Ганеева¹, А. Х. Валиуллина¹, Е. А. Змиевская¹, Э. Р. Булатов^{1,2}

¹*Казанский федеральный университет*

²*Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

I. A. Ganeeva¹, A. K. Valiullina¹, E. A. Zmievskaya¹, E. R. Bulatov^{1,2}

¹*Kazan Federal University*

²*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ IAGaneeva@kpfu.ru

Аннотация

Поиск уникальной мишени для CART-терапии солидных опухолей является актуальной задачей современной биомедицины. В данной работе была проведена оценка цитотоксического эффекта CART-клеток с сконструированным NKG2D-рецептором, показана их более высокая цитотоксическая активность относительно контрольных Т-клеток.

Abstract

The selection of a unique target for CART-therapy of solid tumors is an urgent task of modern biomedicine. In this work, we evaluated the cytotoxic effect of CART cells with the engineered NKG2D receptor and showed their higher cytotoxic activity relative to control T cells.

Введение

CART-терапия — это вид аутологичной терапии онкологических заболеваний с использованием Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). В настоящее время данный вид терапии является многообещающим вариантом лечения онкологических заболеваний, однако ее высокая эффективность была показана только в отношении гематологических онкологических заболеваний. Другие виды опухолей слабо поддаются CART-терапии [1]. Поиск мишени специально для солидных опухолей является одной из ключевых задач для улучшения данного типа терапии. Один из возможных вариантов — система рецептора NKG2D и его лигандов [2], поскольку экспрессия лигандов NKG2D (NKG2DL) повышена во всех клетках, подвергшихся любым изменениям, в том числе малигнизации. NKG2DL могут стать универсальным антигеном для применения в терапии солидных новообразований методом CART-терапии.

Методы

Клетки CART получали лентивирусной трансдукцией с использованием сульфата протамина. Линия опухолевых клеток A549 (которая не экспрессирует гены NKG2DLs), сверхэкспрессирующая MICA, также была получена с помощью лентивирусной трансдукции. Для оценки эффективности полученных клеток NKG2D-CART проводили совместное культивирование линий опухолевых клеток и клеток CART с последующим МТТ-тестом. Биосенсорный анализ проводили с использованием xCELLigence (Roche). Для всех тестов в качестве контроля использовали Т-клетки, соотношение CART или Т-клеток к опухолевым клеткам составляло 2 : 1.

Результаты

Эффективность трансдукции CART клеток составила 16 %. МТТ-тестом показано, что в клеточной линии A549(MICA+) происходит достоверное снижение конfluентности клеточной линии после добавления Т-клеток и после добавления CART-клеток. При этом снижение при добавлении CART-клеток достоверно более значительное, чем при добавлении Т-клеток. Биосенсорный клеточный анализ в режиме реального времени выявил выраженное снижение пролиферативной активности клеточных линий A549, A549(MICA+), после добавления

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22- 74-10076.

CAR-T-клеток. Кроме того, после добавления T-клеток также отмечено снижение пролиферативной активности клеточных линий A549, A549(MICA+).

Заключение

CART-клетки показали более высокую эффективность по сравнению с контрольными T-клетками, однако высокий цитотоксический эффект был выявлен не только против клеточной линии гиперэкспрессирующей NKG2D лиганды, но и в клеточной линии, не несущей лиганды. Таким образом, можно сделать вывод о работоспособности выбранной конструкции CAR-рецептора, однако требуется доработка контрольных линий.

Литература

1. Titov A., Valiullina A., Zmievsкая E. et al. Advancing CAR T-cell therapy for solid tumors: Lessons learned from lymphoma treatment // *Cancers*. 2020. Vol. 12. P. 125.
2. Sentman C. L., Meehan K. R. NKG2D CARs as cell therapy for cancer // *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2014. Vol. 20 (2). P. 156-159.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-67

**ДЕГРАДАЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ В ВОДНОЙ И ПОЧВЕННОЙ ЭКОСИСТЕМАХ
БИООРГАНИЧЕСКИМИ КОМПОЗИЦИЯМИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ*****DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN WATER AND SOIL ECOSYSTEMS
BY BIOORGANIC COMPOSITIONS BASED ON HUMIC ACIDS**

М. М. Герцен, Л. В. Переломов

Тульский государственный педагогический университет им. Л. Н. Толстого

M. M. Gertsen, L. V. Perelomov

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University

✉ mani.gertsen@gmail.com

Аннотация

В работе изучали детоксицирующее действие гуминовых кислот и бактерий-нефтедеструкторов по отношению к нефтезагрязненной воде и почве. Эмульгирование токсикантов уменьшается в ряду: «ГК + *Ps. fluorescens* 142 NF» > «ГК + *R. erythropolis* S67», «ГК + *R. erythropolis* X5». В почве применение композиций приводит к снижению токсического уровня с V (очень высокое содержание) до I (допустимое содержание).

Abstract

The detoxifying effect of humic acids and oil-degrading bacteria in the relation to oil-contaminated water and soil was studied. Emulsification of toxicants decreases in the series: "HAs + *Ps. fluorescens* 142NF" > "HAs + *R. erythropolis* S67", "HAs + *R. erythropolis* X5". In soil, the application of the compositions results in a decrease in the toxic level from V (very high content) to I (acceptable content).

Одним из перспективных способов инактивации нефтепродуктов является метод биодегradации на основе бактерий-нефтедеструкторов [1]. Актуальным представляется использование бактерий с природными полимерами — гуминовыми кислотами (ГК) в составе биоорганических композиций. ГК облегчают перенос электронов от микроорганизмов к углеводородам нефти, выступая в качестве окислительно-восстановительного медиатора [2]. Целью работы является изучение биодегradирующей способности гуминовых кислот, совместно с бактериями-нефтедеструкторами, по отношению к углеводородам нефти для разработки эффективных технологий ремедиации нефтезагрязненных экосистем.

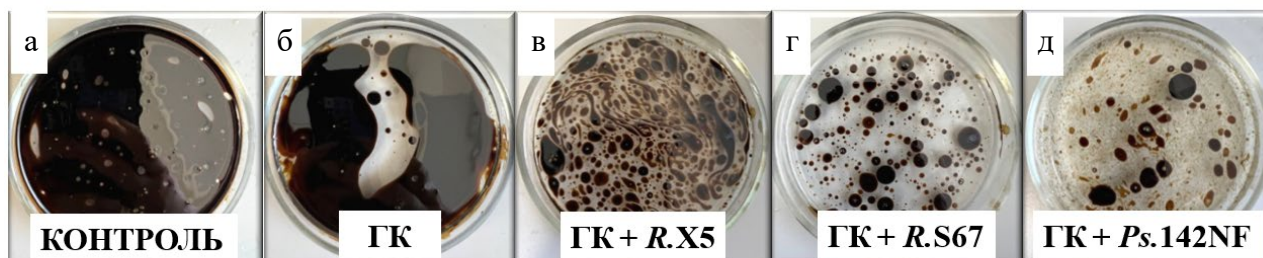
Объект исследования — ГК, выделенные щелочной экстракцией из тростникового низинного торфа Рязанской области [3]. Бактерии-нефтедеструкторы *Rhodococcus erythropolis* S67, *Rhodococcus erythropolis* X5, *Pseudomonas fluorescens* 142NF предоставлены лабораторией биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН и Всероссийской коллекцией микроорганизмов. Модельные токсиканты — сырая нефть с НПЗ АО «Газпромнефть-МНПЗ», отработанное синтетическое моторное масло (ОСММ) Total quartz 5w40.

Установлено, что применение биоорганических композиций на основе ГК и бактерий существенно влияет на эмульгирование сырой нефти: спустя 7 суток экспозиции наблюдается интенсивное дробление и разрыв краев пленки (см. рисунок). На рисунке *в* — максимальный рост количества капель вследствие эмульгирующего эффекта ГК и бактерий, под буквами *г*, *д* наблюдается их уменьшение вследствие потребления бактериями. Визуальный деградирующий эффект композиций уменьшается в ряду: «ГК + *Ps. fluorescens* 142NF» > «ГК + *R. erythropolis* S67», «ГК + *R. erythropolis* X5».

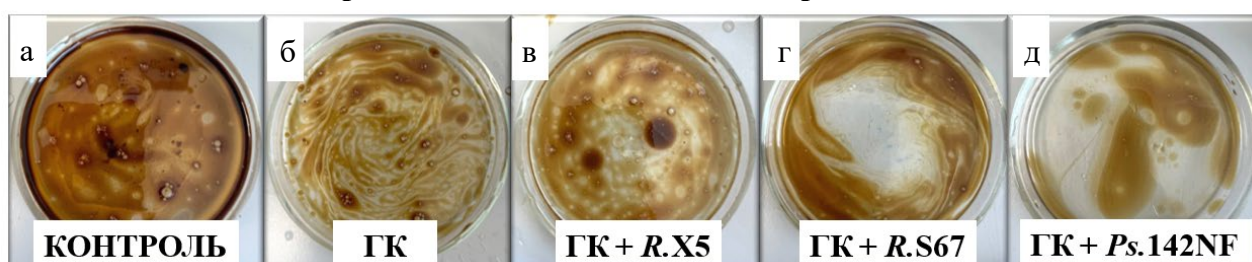
Распределение масляных эмульсий под действием композиций отличается: пленки ОСММ не разбиваются на отдельные капли, происходит их истощение и образование более тонкой, особенно в периферической части, неоднородной пленки с длинными рваными краями (см. рисунок, *б-г*). Вязкие нефтепродукты склонны к образованию плотных фрагментов на водной поверхности, имеющих низкую тенденцию к дисперсии. Поэтому для ОСММ (вязкость 54,2 мм²/с) возможен иной механизм их биодегradации по сравнению с сырой нефтью.

* Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Иммобилизация тяжелых металлов продуктами взаимодействия слоистых силикатов с почвенным органическим веществом и микроорганизмами». (Средства дополнительного соглашения № 073-03-2023-030/2 от 14.02.2023 к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) 073-00030-23-02 от 13.02.23.)

Сырая нефть



Отработанное синтетическое моторное масло



Влияние гуминовых кислот и биоорганических композиций на эмульгирование пленок токсикантов [4]

Детоксицирующее действие композиций проводили на серой лесной почве, загрязненной нефтепродуктами (V уровень загрязнения). По данным флуориметрии рассчитывали процент биодegradации (см. таблицу).

Степень биодegradации (%) нефтепродуктов

Вариант опыта	Степень биодegradации, %					
	Сырая нефть			ОСММ		
	3 суток	5 суток	14 суток	3 суток	5 суток	14 суток
Контроль	0	0	0	0	0	0
ГК	31	49	65	24	43	60
ГК + <i>R. erythropolis</i> X5	35	42	50	27	44	60
ГК + <i>R. erythropolis</i> S67	36	42	54	30	48	69
ГК + <i>Ps. fluorescens</i> 142NF	39	55	83	35	49	75

Исследования динамики содержания нефтепродуктов в почве в течение 14 суток показало, что при использовании и ГК, и биоорганических композиций на их основе наблюдалось постепенное снижение уровня загрязнения. Минимальный эффект наблюдается в случае применения гуминовых кислот отдельно. На 14-е сутки экспозиции содержание нефтепродуктов в почве снизилось на 60–65 % по сравнению с контролем; при добавлении суспензии биоорганических композиций на основе ГК и штаммов — на 50–83 % соответственно, в зависимости от токсиканта. Максимальная дegradация и сырой нефти, и ОСММ происходит при действии композиции «ГК + *Ps. fluorescens* 142NF».

Литература

1. Michael-Igolima U., Abbey S. J., Ifelebuegu A. O. A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils // *Environmental Advances*. 2022. Vol. 9. P. 100319.
2. Yang F., Tang C., Antonietti M. Natural and artificial humic substances to manage minerals, ions, water, and soil microorganisms // *Chemical Society Reviews*. 2021. Vol. 50 (10). P. 6221–6239.
3. Роганов В. Р., Касимова Л. В., Тельянова А. В. и др. Исследование способов извлечения из низинного торфа гуминовых препаратов // *Современные проблемы науки и образования*. 2014. № 6. С. 1411–1411.
4. Gertsen M. M., Perelomov L. V., Arlyapov V. A. et al. Degradation of Oil and Petroleum Products in Water by Bioorganic Compositions Based on Humic Acids // *Energies*. 2023. Vol. 16 (14). P. 5320.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-68

СКРИНИНГ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ В ОТНОШЕНИИ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ *GALLERIA MELLONELLA* L. И ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ *CYDIA POMONELLA* L.*

SCREENING OF BACTERIAL STRAINS IN RELATION TO THE LABORATORY POPULATION OF THE LARGE WAX MOTH *GALLERIA MELLONELLA* L. AND THE NATURAL POPULATION OF THE APPLE MOTH *CYDIA POMONELLA* L.

Е. Ю. Гырнец, А. М. Асатурова

Федеральный научный центр биологической защиты растений, Краснодар

E. Yu. Gyrnets, A. M. Asaturova

Federal Research Center of Biological Plant Protection, Krasnodar

✉ alena_fox95@mail.ru

Аннотация

Проведены исследования по оценке инсектицидной активности штаммов бактерий из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов». Эксперименты проводили в лабораторных условиях в отношении лабораторного тест-объекта большой восковой моли *Galleria mellonella* L. и экономически значимого фитофага — природной популяции яблонной плодовой моли *Cydia pomonella* L.

Abstract

Studies have been conducted to assess the insecticidal activity of bacterial strains from the of the bioresource collection of the Federal Research Center of Biological Plant Protection “State Collection of Entomoacariphages and Microorganisms”. The experiments were carried out under laboratory conditions in relation to a laboratory test object of the large wax moth *Galleria mellonella* L. and an economically significant phytophagus — the natural population of the apple fruit moth *Cydia pomonella* L.

В настоящее время отмечается позитивная тенденция создания новых микробиологических средств для защиты сельскохозяйственных культур от различных вредных организмов. Среди них наиболее распространены бактериальные инсектициды на основе спор и токсинов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis*. К ключевым достоинствам таких препаратов можно отнести отсутствие фитотоксичности, высокую специфичность и безопасность [1]. Изучение эффективности микроорганизмов включает ряд этапов: выбор источника или места для поиска микроорганизмов, выделение и скрининг штаммов, исследование потенциальных биоагентов и полевые испытания [2]. В связи с этим актуальны поиск и изучение высокоэффективных штаммов бактерий с энтомопатогенными свойствами для разработки на их основе экологически безопасных биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур.

Исследования проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений» с использованием материально-технической базы УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» [3]. Разведение насекомых осуществляли в лаборатории химической коммуникации и массового разведения насекомых, в лаборатории государственной коллекции энтомоакарифагов и первичной оценки биологических средств защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР с использованием УНУ «Технологическая линия по массовому разведению насекомых-энтомофагов» [4].

В лабораторных условиях был проведен последовательный скрининг перспективных штаммов бактерий из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» по критериям инсектицидной активности.

Исследования проводили по общепринятым методам тестирования энтомопатогенных микроорганизмов [5] в отношении лабораторных популяций большой восковой моли *G. mellonella* L. и природной популяции яблонной плодовой моли *C. pomonella* L.

Большую восковую моль *G. mellonella* L., ввиду ее физиологических особенностей, используют в научно-практических целях как модельный объект не только для физиологических и биохимических исследований, но

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-16-00260.

© Е. Ю. Гырнец, А. М. Асатурова, 2023

и для оценки активности и качества биопрепаратов, а также как кормовую базу для хищных клопов, мух-тахин, трихограмм и др. В результате скрининга 50 культур бактерий были отобраны штаммы с высокой инсектицидной активностью в отношении большой восковой моли *G. mellonella* L. к 5-м суткам исследований, которая составила от 82,1 до 96,6 %.

Тщательный отбор и изучение свойств биоагентов по критерию энтомопатогенности, а также восприимчивости организма-хозяина являются ключевыми задачами агробиотехнологии для создания эффективного биоинсектицида. Для оценки инсектицидной активности перспективных биоагентов в отношении яблонной плодовой жоржки *C. pomonella* L. использовали гусениц, полученных из яблок со стационарной базы ФГБНУ ФНЦБЗР. В результате исследований выявлены наиболее эффективные штаммы бактерий в отношении природной популяции яблонной плодовой жоржки *C. pomonella* L., которые проявили максимальную активность на гусеницах младших возрастов в диапазоне от 64,7 до 71,4 % на 5-е сутки.

Литература

1. Штерншис М. В., Андреева И. В., Томилова О. Г. Биологическая защита растений. 2018. С. 241–250.
2. Slininger P. J. et al. Discovery and development of biological agents to control crop pests // *Neotropical Entomology*. 2003. Vol. 32. P. 183–195.
3. Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения. URL: <https://ckp-rf.ru/usu/671367/>.
4. Технологическая линия по массовому разведению насекомых-энтомофагов. URL: <https://ckp-rf.ru/catalog/usu/671922/>.
5. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / под ред. В. В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 352–427.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-69

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВРЕМЕНИ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП «ПОЛИМЕРНЫХ ЩЕТОК» *

STUDY OF THE INFLUENCE OF UV IRRADIATION TIME ON THE FUNCTIONALITY OF CARBOXY GROUPS OF "POLYMER BRUSHES"

Г. М. Детков, О. А. Заседателева, В. А. Василисков, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

G. M. Detkov, O. A. Zasedateleva, V. A. Vasiliskov, A. V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ 777detkov@mail.ru

Аннотация

Выполнена химическая модификация полипропиленовой подложки прививкой «щеточных полимеров» методом фотоиндуцированной литографической полимеризации. Определена зависимость интенсивности сигнала ковалентно связанного флуоресцентного красителя с функциональными группами «полимерных щеток» от времени облучения ультрафиолетовым светом.

Abstract

A chemical modification of a polypropylene substrate by grafting "brush polymers" by photoinduced lithographic polymerization was performed. The dependence of the signal intensity of a covalently bound fluorescent dye with the functional groups of "polymer brushes" on the ultraviolet light irradiation time was determined.

Луночные планшеты являются наиболее популярными платформами для проведения биоанализа. Они могут стать хорошей основой для высокочувствительного параллельного многофакторного и быстрого детектирования биомолекул за счет нанесения в лунку микроячеек с «полимерными щетками» с функциональными группами и дальнейшей иммобилизации молекулярных зондов посредством ковалентного связывания в них. Для прививки «полимерных щеток» от поверхности фотолитографическим методом желательнее использование УФ-прозрачных материалов, которые позволяют проводить облучение снизу вверх. Это приводит к селективному росту щеток от поверхности с наименьшим образованием полимерной фазы в растворе. Поэтому важным фактором для использования планшета с микроячейками в лунках является материал, из которого он состоит. Некоторые планшеты изготавливаются из УФ-прозрачных материалов, таких как кварцевое стекло, полипропилен (ПП) или циклоолефиновый сополимер (ЦОС). ЦОС обладает такими свойствами, как высокая химическая стойкость, хорошая оптическая прозрачность в ближнем УФ-диапазоне, низкая автофлуоресценция и простота изготовления. Это делает его использование перспективным в качестве материала для луночных планшетов с микроячейками. В качестве модели луночных планшетов из ЦОС в работе использованы полимерные подложки из ПП с нанесенным слоем ЦОС (рис. 1).

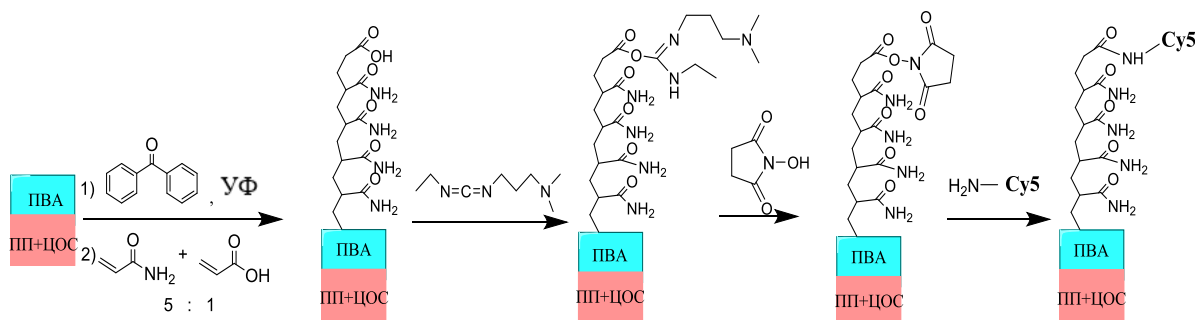


Рис. 1. Химическая схема процесса

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-14-00287-П.

Полимерную подложку из ПП методом центрифугирования предварительно покрывали раствором ЦОС в *n*-ксилоле, а затем раствором поливинилацетата (ПВА) и бензофенона в метилэтилкетоне. Далее на модифицированную поверхность наносили раствор мономеров 0,15 М акриловой кислоты и 0,75 М акриламида в деионизированной воде и облучали УФ-светом ($\lambda = 254$ нм) через фотомаску из кварцевого стекла при заданном времени (рис. 2).

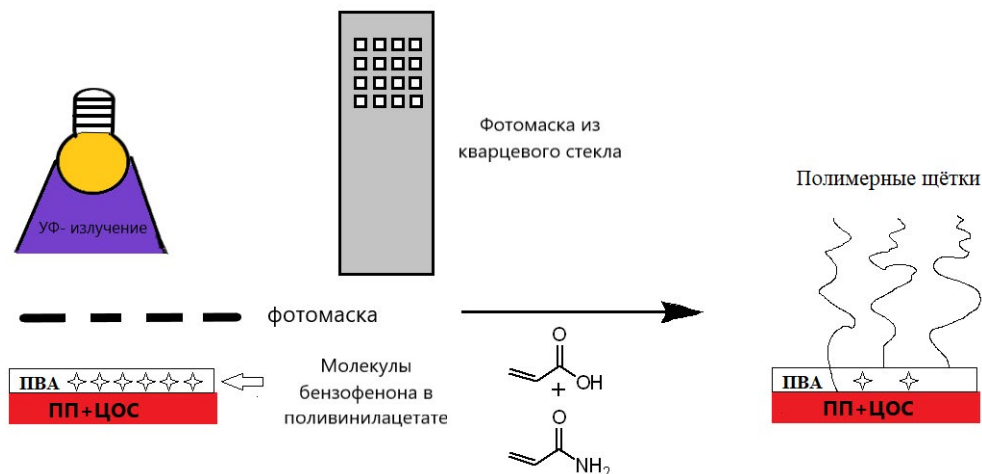


Рис. 2. Схема фотоиндуцированной литографической полимеризации

Активацию карбоксильных групп образовавшихся «полимерных щеток» проводили с использованием 0,2 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и 0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) в MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) буферном растворе с pH 5 в течение 1,5 ч. После окончания реакции чипы промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) с добавлением tween 20.

В качестве метода контроля образования карбоксильных групп «щеточного полимера» использовали иммобилизацию цианинового красителя Cy5 с гексаметилендиаминовым линкером в бикарбонатном буферном растворе (pH 9,5) с регистрацией методом цифровой флуоресцентной микроскопии.

На образование «полимерных щеток» со стерически доступными карбоксильными группами, способными связываться с молекулярными зондами, влияет время облучения УФ-светом (см. таблицу, рис. 3).

Оценка эффективности образования карбоксильных групп «щеточного полимера» в зависимости от времени УФ-облучения при помощи иммобилизации флуоресцентного красителя Cy5

Время УФ-облучения, мин	Средняя интенсивность сигнала	Фоновая интенсивность	Соотношение сигнал/фон
15	8600	1700	5,1
20	17783	500	35,6
40	19748	400	49,4

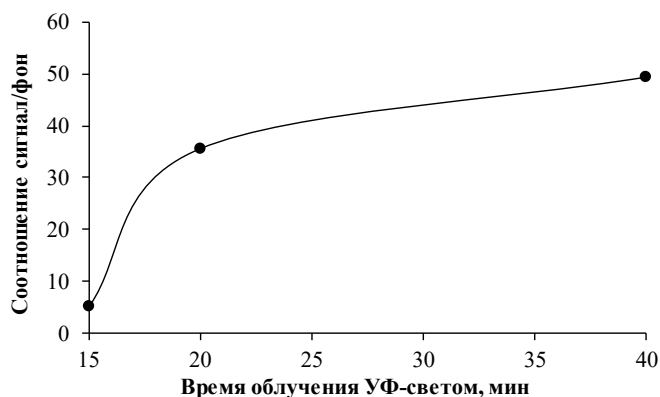


Рис. 3. Зависимость соотношения сигнал/фон от времени облучения УФ-светом

С увеличением времени облучения наблюдается рост интенсивности флуоресценции иммобилизованного красителя Cy5, что свидетельствует об увеличении количества карбоксильных групп «щеточного полимера» или их стерической доступности.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-70

ПОЛУЧЕНИЕ МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА Н7Н9, МЕТОДОМ *IN VITRO* ТРАНСКРИПЦИИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ ПОЛУЧЕННОЙ МРНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК А549

OBTAINING MRNA ENCODING HEMAGGLUTININ OF INFLUENZA A VIRUS SUBTYPE H7N9 BY *IN VITRO* TRANSCRIPTION AND EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF TRANSLATION OF THE OBTAINED MRNA IN THE EUKARYOTIC CELL LINE A549

О. А. Добровольская¹, Е. А. Елпаева¹, В. В. Высочинская^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

O. A. Dobrovolskaya¹, E. A. Elpaeva¹, V. V. Vysochinskaya^{1,2}

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

²Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University

✉ dobrovolskaya.od@gmail.com

Аннотация

Вакцины на основе РНК — это новейшая многообещающая альтернатива традиционным подходам к лечению вирусных заболеваний. В этом исследовании мы получили мРНК, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа А подтипа Н7Н9, методом *in vitro* транскрипции и провели оценку эффективности ее трансляции на линии клеток А549. Показано, что полученная мРНК эффективно доставляется и транслируется *in vitro* и может быть успешно использована для дальнейших экспериментов *in vivo*.

Abstract

RNA-based vaccines are the newest promising alternative to traditional approaches to treat viral diseases. In this study, we obtained mRNA encoding the hemagglutinin of influenza A subtype H7N9 by *in vitro* transcription and evaluated the efficiency of its translation on the A549 cell line. It was shown that mRNA is efficiently delivered and translated *in vitro* and can be successfully used for further experiments *in vivo*.

Вирус гриппа является одним из наиболее распространенных патогенов и по-прежнему представляет собой глобальную проблему общественного здравоохранения во всем мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируется от 400 до 600 тыс. летальных исходов и от 3 до 5 млн случаев тяжело течения гриппа, требующих медицинского вмешательства во всех возрастных группах [1].

Вакцины являются одним из важнейших инструментов общественного здравоохранения и играют важную роль в борьбе с инфекционными заболеваниями [2]. Лекарственные препараты на основе РНК являются одним из наиболее перспективных направлений современной вакцинологии. Молекулы мРНК обладают широким терапевтическим потенциалом и могут стать альтернативой классическим вакцинам в связи с их высокой эффективностью, возможностью быстрой разработки и потенциально дешевым производством. Все упомянутые преимущества подчеркивают значительный потенциал мРНК в качестве нового терапевтического агента против вируса гриппа [3].

Современные вакцины в первую очередь нацелены на вирусный поверхностный гликопротеин — гемагглютинин (НА), характеризующийся высокой частотой мутаций для противодействия иммунному ответу и генетической рекомбинации между различными штаммами вируса.

Цели данной работы — получение мРНК, кодирующей НА вируса гриппа, методом *in vitro* транскрипции (IVT) и оценка эффективности трансляции полученной мРНК. В качестве модели для экспериментальной проверки биологической активности мРНК был выбран НА вируса гриппа А подтипа Н7Н9.

Была сконструирована оригинальная генетическая конструкция с использованием вектора рЕТ28а(+), кодирующая ген целевого белка. Был получен штамм-продуцент на основе клеток *Escherichia coli DH5alpha* для работы плазмидной ДНК. Клонирование гена НА было подтверждено контрольным секвенированием ДНК методом Сэнжера и рестрикционным анализом полученной плазмиды рЕТ28НА7.

Для синтеза мРНК методом IVT были использованы наборы реагентов компании Jena Bioscience, которые включали в себя в качестве 5'-кэп структуры молекулу ARCA (Anti-Reverse Cap Analog). Также для увеличения

эффективности трансляции мРНК были использованы модифицированные нуклеотиды компании ООО «Биолабмикс». В качестве матрицы для реакции IVT использовали плазмидную ДНК рЕТ28-НА7, лианеризованную по сайту рестрикции XhoI. После проведения реакции IVT для разрушения матричной плазмидной ДНК пробу, содержащую реакционную смесь, подвергали ДНКазной обработке. Для полиаденилирования полученной мРНК использовали коммерческий набор (Jena Bioscience). Далее полученная мРНК была очищена с помощью набора RNA Clean&Concentrator (Zyma Research). Было получено 57 мкг мРНК-НА7, содержащей модифицированные нуклеозиды, 5'-кэп и 3'-поли(А) структуры. Верификацию полученной мРНК производили методом горизонтального электрофореза в агарозном геле. Размер полученного транскрипта соответствовал теоретически рассчитанному — 1773 пар оснований.

На следующем этапе работы была проведена оценка трансляционной активности полученной мРНК в клеточной системе А549. Трансфекцию полученной мРНК в клетки А549 проводили с использованием коммерческого липосомального трансфекционного реагента Lipofectamine MessengerMAX в качестве контроля трансфекции и катионных липосом на основе поликатионного амфифила 2X3 и хелперного липида 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DOPE) в молярном соотношении 1 : 3 соответственно. Через 24 ч после трансфекции в клетках методом иммуноферментного анализа (ИФА) был выявлен белок гемагглютинина НА7. Было показано, что полученная синтетическая мРНК эффективно доставляется и транслируется в клетках А549 используемыми методами доставки. При этом катионные липосомы 2X3-DOPE (1 : 3) обеспечивают эффективность трансляции белка НА7 на уровне с коммерческим носителем.

Трансляция белка Н7 также была подтверждена с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, и было показано, что транслируемый белок имеет преимущественно мембранную локализацию.

По результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что полученная синтетическая мРНК, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа А подтипа Н7Н9, эффективно доставляется и транслируется *in vitro* и может быть успешно использована для дальнейших экспериментов *in vivo*.

Литература

1. WHO Seasonal Influenza Fact Sheet. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
2. Deviatkin A. A., Simonov R. A., Trutneva K. A. et al. Universal Flu mRNA Vaccine: Promises, Prospects, and Problems // Vaccines (Basel). 2022. Vol. 10 (5). P. 709.
3. Shartouny J. R., Lowen A. C. Message in a bottle: mRNA vaccination for influenza // J. Gen. Virol. 2022. Vol. 103 (7).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-71

АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ CRISPR/CAS9 СИСТЕМЫ НА УРОВНЕ РНК***ALLOSTERIC REGULATION OF CRISPR/CAS9 SYSTEM ON THE RNA LEVEL**О. А. Должикова^{1,2}, О. А. Семиколонова¹, М. И. Мещанинова¹, Д. С. Новопашина^{1,2}¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*O.A. Dolzhikova^{1,2}, O.A. Semikolenova¹, M.I. Meschaninova¹, D.S. Novopashina^{1,2}¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*

✉ o.dolzhikova@g.nsu.ru

Аннотация

CRISPR/Cas9 системы применяют для направленного внесения двуцепочечного разрыва в ДНК. Многообещающим способом повышения специфичности таких систем является аллостерическая регуляция. Нами были созданы направляющие РНК, содержащие аптамер к теofilлину или флуорогенный аптамер Mango, а также исследована их функциональная активность на примере расщепления модельной ДНК в присутствии и в отсутствие теofilлина или тиазолового оранжевого соответственно.

Abstract

CRISPR/Cas9 systems are commonly used for the introduction of double-strand break at the targeted point of DNA. A possible way to improve its specificity is allosteric regulation. Here, we designed guide RNA containing theophylline-binding or Mango aptamer and investigated their functional activity by the example of the model DNA cleavage either in absence or in presence of theophylline or thiazole orange respectively.

Усовершенствование системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 в плане точности и эффективности действия является актуальной научной проблемой. Одним из подходов к ее решению является создание аллостерически регулируемых систем CRISPR/Cas9. Такие системы могут быть использованы как для регуляции системы при изменении концентрации определенных биомолекул в системе, так и для детекции этих биомолекул. Аллостерическая регуляция осуществляется путем связывания конкретных молекул с определенными сайтами фермента или аптамером, изменения конформации биомолекулы и активации или ингибирования ее активности.

Целью нашей работы было создание системы CRISPR/Cas9, действие которой можно аллостерически регулировать на уровне РНК. В качестве регуляторного фрагмента нами выбраны аптамер к теofilлину и флуорогенный аптамер Mango.

На основе анализа литературных данных можно заключить, что наиболее удачными являются варианты дизайна направляющих РНК, в которых аптамер к теofilлину вводят в верхний стебель, связующую петлю или шпильку, находящиеся на 3'-конце sgРНК [1–3]. Нами был выбран вариант, при котором небольшой фрагмент (4–5 нуклеотидов) направляющей РНК заменяют на последовательность аптамера. В отсутствие теofilлина палиндромные последовательности, расположенные с 3'- и 5'-стороны от аптамера, образуют шпильку. Нами был проведен дизайн направляющих crРНК и tracrРНК с аптамером к теofilлину. Серии направляющих РНК (crРНК, tracrРНК и sgРНК), содержащих и не содержащих аптамер к теofilлину, были получены твердофазным фосфитамидным методом. Для введения аптамера Mango нами была сконструирована crРНК, содержащая аптамер в верхней петле. Была исследована эффективность расщепления плазмидной ДНК нуклеазой Cas9 в присутствии направляющих РНК (sgРНК или пары crРНК/tracrРНК), содержащих аптамер, в присутствии и отсутствие теofilлина. Обнаружены значительные различия в эффективности расщепления модельной ДНК в зависимости от расположения аптамера в структуре направляющих РНК и наличия в системе теofilлина.

Аллостерически регулируемые системы CRISPR/Cas9 являются потенциальными инструментами для направленного управляемого расщепления ДНК.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00294.

© О. А. Должикова, О. А. Семиколонова, М. И. Мещанинова, Д. С. Новопашина, 2023

Литература

1. Lin B. et al. Control of CRISPR-Cas9 with small molecule-activated allosteric aptamer regulating sgRNAs // Chem. Commun. 2019. Vol. 55. P. 12223–12226.
2. Kundert K. et al. Controlling CRISPR-Cas9 with ligand-activated and ligand-deactivated sgRNAs // Nat. Commun. 2019. Vol. 10, № 1. P. 2127.
3. Englert D. et al. Fast-exchanging spirocyclic rhodamine probes for aptamer-based super-resolution RNA imaging // Nat. Commun. 2023. Vol. 14. P. 3879.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-72

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУРФАКТАНТОВ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ
ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) И ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА)

EFFECT OF SURFACTANTS ON THE CHARACTERISTICS OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)
AND POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) NANOPARTICLES

А. С. Дорохин, С. Ю. Липайкин

Сибирский федеральный университет, Красноярск

A. S. Dorokhin, S. Yu. Lipaikin

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

✉ dorokhin.al3x@gmail.com

Аннотация

В работе исследовано влияние шести неионогенных и двух анионных сурфактантов на характеристики наночастиц поли(3-гидроксибутирата) и поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата), полученных методом испарения растворителя из эмульсии. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве сурфактанта поливиниловых спиртов различных марок с относительно низкой молекулярной массой.

Abstract

In this work, the effect of six non-ionic and two anionic surfactants on the characteristics of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles obtained by single emulsion solvent evaporation technique was assessed. The most satisfactory results were obtained when polyvinyl alcohols with relatively low molecular weight were used as a surfactant.

Сурфактанты — поверхностно-активные вещества, стабилизирующие эмульсию в процессе получения полимерных наночастиц (NPs) эмульсионными методами. Сурфактанты оказывают существенное влияние на характеристики получаемых NPs и стабильность образуемых ими коллоидных растворов. При этом, насколько нам известно, комплексные исследования влияния сурфактантов на характеристики наночастиц из многих биоразлагаемых материалов, включая полигидроксиалканоаты, не описаны в специализированной научной литературе.

Наночастицы поли(3-гидроксибутирата) (P3НВ; M_w 355 кДа) и поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата) (P3НВV; содержание 3-гидроксивалерата 10,2 %, M_w 826 кДа) были получены методом испарения растворителя из эмульсии. Для этого раствор полимера в CHCl_3 (10 мг/см³) по каплям добавляли к водному раствору сурфактанта (0,5 % w/v для всех сыпучих веществ и 0,5 % v/v для Tween 20 и Tween 80) на высокоскоростном гомогенизаторе и выдерживали при 24000 об/мин в течение 5 мин, после чего полученную эмульсию помещали на магнитную мешалку на сутки при 1000 об/мин до полного испарения органического растворителя. В качестве сурфактантов были использованы поливиниловые спирты (PVA) различных производителей и марок (Sigma-Aldrich, США: 31–50 кДа и 85–124 кДа; АО «Невинномысский азот», Россия: марки 11/2 и 16/1), Tween 20 (Panreac Applicem, Германия) и Tween 80 (Amresco, США), а также анионные сурфактанты: натрия дезоксихолат (SDC) (Acros Organics, Бельгия) и натрия додецилсульфат (SDS) (Helicon, Россия). Выход частиц (yield, Y) рассчитывали относительно исходной массы полимера. Средний размер частиц и их ζ -потенциал измеряли на Malvern Zetasizer Nano ZS.

Наилучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве сурфактанта PVA, однако PVA от Sigma-Aldrich с $M_w = 85–124$ кДа полностью не десорбировался с поверхности наночастиц, что приводило к их агрегации и образованию гелей. В то же время NPs, полученные с использованием SDC и SDS, имели выраженную склонность к агрегации и седиментации и не ресуспендировались после отмывки от сурфактанта. Tween 80 и Tween 20 в исследованной концентрации также оказались непригодны для получения наночастиц P3НВ и P3НВV, поскольку NPs в этих образцах агрегировали и имели очень широкое размерное распределение. Характеристики полученных наночастиц представлены в таблице.

Характеристики наночастиц РЗНВ и РЗНВУ, полученных с применением неионогенных и анионных сурфактантов

Полимер	Сурфактант	У, %	d, нм	ζ-потенциал, мВ
РЗНВ	PVA (31-50 кДа)	98,2	962,4	-28,5
	PVA (85-124 кДа)	101,7	—	
	PVA-11/2	89,4	894,1	-27,3
	PVA-16/1	88,5	796,9	-32,5
	Tween 20	81,0	—	
	Tween 80	85,9		
	SDC	79,4		
	SDS	53,5		
РЗНВУ	PVA (31-50 кДа)	94,1	910,6	-28,5
	PVA (85-124 кДа)	—		
	PVA-11/2	92,7	875,2	-21,8
	PVA-16/1	91,3	852,6	-23,9
	Tween 20	87,5	—	
	Tween 89	92,6		
	SDC	59,8		
	SDS	42,9		

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-73

**РАССАСЫВАЮЩИЕСЯ НЕТКАНЫЕ НАНОМЕМБРАНЫ
ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА-СО-4-ГИДРОКСИБУТИРАТА
ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ***

**RESORBABLE ELECTROSPUN POLY-3-HYDROXYBUTYRATE-CO-4-HYDROXYBUTYRATE
NANOMEMBRANES FOR DRUG DELIVERY AND TISSUE ENGINEERING**

А. Е. Дудаев, Г. А. Рыльцева

Институт биофизики СО РАН, Красноярск

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, Красноярск

A. E. Dudaev, G. A. Ryltseva

Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

School of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk

✉ alex15-96@mail.ru

Аннотация

Биоразлагаемые полигидроксиалканоаты, биополимеры микробиологического происхождения, состоящие из 3- и 4-гидроксибутиратных мономеров, были использованы для получения методом электроспиннинга наномембран, нагруженных лекарственными препаратами (цефтазидимом, дорипинемом и актовегином), в качестве клеточных носителей, перспективных для лечения раневых дефектов, осложненных инфекцией.

Abstract

Biodegradable polyhydroxyalkanoates, biopolymers of microbiological origin, consisting of 3- and 4-hydroxybutyrate monomers, were used to obtain by electrospinning nanomembranes loaded with drugs (ceftazidime, doripinam, and actovegin) as cell carriers promising for the treatment of wound defects complicated by infection.

Электростатическое формование (ЭСФ) — один из наиболее перспективных методов получения материалов и изделий для биомедицины. Принцип метода основан на образовании ультратонких вытянутых структур в электростатическом поле, образованном между противоположно заряженными электродами, когда один из них находится в расплаве или растворе полимерного материала, второй размещается на приемном металлическом коллекторе (мишени). Метод ЭСФ позволяет получать ультра- и нанотонкие волокна и пористые нетканые наномембраны из растворов и расплавов полимеров различного строения, которые применяют в медицине, биоинженерии, электронике, для фильтрации газов и жидкостей, в создании композиционных материалов и т. д.

Нетканые наноматериалы на основе ультратонких волокон служат не только субстратом (матриком) для выращивания клеток, но также могут использоваться в качестве носителей лекарственных препаратов. Использование таких систем особенно актуально для локального лечения поврежденных участков органов и тканей, включая защиту и лечение поврежденных тканей в постоперационном периоде. Таким образом, области, особо нуждающиеся в функциональных наноматриксах, полученных методом ЭСФ, — это клеточная и тканевая инженерия, связанные с восстановлением поврежденных органов и тканей, и создание долговременных и контролируемых систем депонирования и доставки лекарственных средств.

Особо востребованы и перспективны ЭСФ изделия, получаемые из резорбируемых полимерных материалов, среди которых полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, так называемым полигидроксиалканоаты (ПГА). Эти полимеры, наряду с полилактидами и полигликолидами, имеют большой потенциал для практического применения в различных сферах, от коммунального и сельского хозяйства до реконструктивной медицины и фармакологии. ПГА — это резорбируемые «зеленые» биопластики микробиологического происхождения, обладающие уникальным набором свойств, включая высокую биосовместимость, отсутствие гидролиза в водных средах, длительную деградацию в биологических средах *in vitro* и *in vivo*, термопластичность, пьезоэлектрический эффект, возможность переработки в изделия из различных фазовых состояний доступными способами, а также

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 0287-2021-0025).

широкий диапазон физико-механических характеристик, которые зависят от химического состава разнообразных типов ПГА.

Это определило цель данной работы, в которой представлены результаты конструирования методом ЭСФ нетканых мембран из резорбируемых низкокристаллических и высокоэластичных сополимеров 3- и 4-гидроксипутирата П(ЗГБ-со-4ГБ), нагруженных лекарственными препаратами различной природы, исследования их характеристик и биологической активности по отношению к патогенам (*E. coli* и *St. aureus*) и клеткам фибробластического ряда НИИ ЗТЗ.

Для работы использован сополимер поли-3-гидроксипутирата-со-4-гидроксипутирата, синтезированный природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10646 с соотношением мономеров ЗГБ и 4ГБ, равным 74 и 26 мол.% соответственно, по собственной разработанной технологии в Институте биофизики СО РАН [1].

В качестве лекарственных средств были использованы препараты с различным механизмом действия: антибиотики Саноцеф® (дорипинем) и Протозидим® (цефтазидим), а также Actovegin® — препарат, активизирующий обмен веществ в тканях, улучшающий трофику и стимулирующий процесс регенерации.

Нетканые мембраны, образованные ультратонкими волокнами, получали с использованием автоматической установки Nanon 01A.

Было показано, что нетканые мембраны являются долговременной формой для доставки и высвобождения лекарств. Мембраны, нагруженные антибиотиками, обладают антибактериальной активностью и ингибируют развитие *E. coli* и *St. aureus*. В культуре НИИ ЗТЗ они не проявляют негативного влияния на клеточную адгезию и пролиферацию, несмотря на наличие антибиотиков. Это позволяет сделать вывод о том, что разработанные нетканые мембраны пригодны для длительной доставки лекарственных препаратов для лечения инфицированных ран.

Литература

1. Патент № 2439143 С1. Российская Федерация, МПК С12N 1/20, С12Р 7/62. Штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* ВКМП В-10646 — продуцент полигидроксиалканоев и способ их получения: № 2010146514/10: заявл. 15.11.2010; опубл. 10.01.2012 / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-74

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS****ANTIRADICAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS***А. Н. Егоров¹, И. В. Воронов², И. П. Троев¹, Р. А. Готовцев¹¹Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Якутск²Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, ЯкутскA. N. Egorov¹, I. V. Voronov², I. P. Troev¹, R. A. Gotovtsev¹¹Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk²Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk

✉ 291219942014@mail.ru

Аннотация

Изучена эффективность антирадикального и антиоксидантного действия экстрактов, полученных из вздутоплодника сибирского (лат. *Phlojodicarpus sibiricus*). В результате сравнения антирадикальной и антиоксидантной активности экстрактов в зависимости от концентрации экстрагента установлена наибольшая эффективность гашения радикалов 40%-ми водно-этанольными экстрактами в сравнении с коммерческими экстрактами корней родиолы розовой и женьшеня.

Abstract

The effectiveness of the antiradical and antioxidant action of extracts obtained from the Siberian puffball (lat. *Phlojodicarpus sibiricus*) was studied. As a result of comparing the antiradical and antioxidant activity of extracts depending on the concentration of the extractant, the highest efficiency of quenching radicals with 40 % water-ethanol extracts was established in comparison with commercial extracts of *Rhodiola rosea* and ginseng roots.

Цели данного исследования — оценка антирадикальной и антиоксидантной активности экстрактов вздутоплодника сибирского и сравнение их с коммерческими препаратами родиолы розовой и женьшеня. Окислительное повреждение является результатом эндогенных и экзогенных факторов образования активных форм кислорода (АФК). К источникам эндогенного фактора относят митохондриальную электронно-транспортную цепь и реакцию синтеза синтазы оксида азота, а также немитохондриальные реакции [1]. Чрезмерное образование свободных радикалов вызывает угнетение естественной клеточной антиоксидантной защиты и приводит к ухудшению функциональности организма [2]. Одним из важных качеств является стратегия снижения окислительного стресса. Выделяют потребление экзогенных антиоксидантов, как правило, растительного происхождения, богатых полезными компонентами [3, 4]. В этом отношении перспективным, но слабоизученным лекарственным растением является вздутоплодник сибирский, который произрастает на многолетней мерзлоте и может быть источником биологически активных соединений с онкопротекторной и противоопухолевой активностью. Этому свидетельствуют работа [5], где показано, что общее содержание кумаринов варьировало от 36,16 мг/г травы до 98,24 мг/г корней.

Корни и корневища *Phlojodicarpus sibiricus* были собраны на территории Якутии в период цветения и высушены воздушно-теневым способом. Экстракцию проводили методом мацерации в течение 10 дней при комнатной температуре в темноте с использованием 40 и 70%-го этилового спирта в соотношении 1 : 10 (масса — объем).

В процессе сравнения были использованы коммерческие водно-спиртовые настойки «Камелия НПП», содержащие экстракт *R. rosea*, а также настойки женьшеня производства ОАО «Ивановская ФФ». Использовали 70%-й водно-спиртовой экстракт каллусной культуры *P. sibiricus*, полученный из бутонов в условиях культивации на твердых агаризованных средах с определенным содержанием микро- и макросолей и фитогормонов.

Проведены исследования по спектрофотометрии DPPH, ABTS, определение ингибирования супероксида-радикала, измерение NO-ингибирующей активности, а также определение суммарной антиоксидантной активности по ингибированию перекисного окисления липидов (ПОЛ) (см. таблицу) в четырех повторностях.

* Работа выполняется в рамках федерального проекта «Развитие человеческого капитала в интересах регионов, отраслей и сектора исследований и разработок» национального проекта «Наука и университеты», шифр тематики FSRG-2022-0009 «Разработка и испытание новых биомедицинских клеточных продуктов, композиционных медицинских изделий».

Сравнительная антирадикальная и антиоксидантная активность экстрактов

Образцы	Экстракция	Ингибирование (M ± SD)				
		ABTS ⁺ , %	DPPH ⁺ , %	O ₂ ⁻ , %	NO ⁻ , %	ПОЛ, %
<i>Phlojodicarpus sibiricus</i>						
Корни	70 %	94,4 ± 4,5	91,3 ± 4,6	21,9 ± 1,1 ^a	50,3 ± 2,5 ^d	14,7 ± 0,8 ^a
	40 %	95,5 ± 4,6	90,9 ± 4,5	44,9 ± 2,3 ^c	56,5 ± 2,6 ^d	34,2 ± 1,5 ^c
Надземная масса	70 %	98,6 ± 4,6	93,5 ± 4,5	32,4 ± 1,5 ^b	56,9 ± 2,6 ^d	21,6 ± 1,1 ^b
Каллус	70 %	98,3 ± 4,6	94,4 ± 4,7	90,9 ± 4,5 ^d	51,7 ± 2,6 ^d	21,8 ± 1,1 ^b
Коммерческие препараты						
<i>R. rosea</i> L., корни	40 %	99,9 ± 5,0	99,9 ± 4,8	99,9 ± 4,7 ^d	24,4 ± 1,2 ^c	59,3 ± 3,0 ^c
Женьшень, корни	70 %	99,0 ± 4,9	99,0 ± 5,0	0	24,8 ± 1,3 ^c	38,1 ± 1,9 ^c

Для оценки эффективности исследуемых экстрактов были проведены модельные реакции *in vitro*, где использовались непрямые и прямые методы. Полученные результаты показали, что все исследуемые экстракты, включая образцы сравнения, обладали высокой антирадикальной активностью. Эта активность основана на взаимодействии антиоксидантов с хромоген-радикалом (DPPH) и катион-радикалом (ABTS⁺). Все экстракты проявили сопоставимый уровень активности в пределах 90–99 % (см. таблицу). В отношении супероксид-радикала наибольшая ингибирующая активность отмечена у экстракта из каллуса. Экстракт из корней женьшеня не проявил антиоксидантной активности (АОА) в отношении O₂⁻-радикала.

Все представленные экстракты вздутоплодника сибирского обладали ингибирующей активностью NO⁻-радикала, видимо, это обусловлено высоким содержанием биологически активных веществ северного типа *P. sibiricus*. Высокими значениями уровней ингибирования свободно-радикального окисления отличились 40%-е экстракты корней настойки аптечного *R. rosea* L. (59 %). Экстракт, полученный при 40%-й водно-этанольной экстракции, в 2,1 раза превышал уровень ингибирования O₂⁻-радикалов и в 2,3 раза уровень ПОЛ по сравнению с 70%-м экстрактом.

Таким образом, экстракты исследованных растений могут рассматриваться в качестве перспективных средств снижения свободнорадикальной нагрузки, вызванной оксидативным стрессом. Стоит отметить, что у надземной части, корней и каллусной культуры *P. sibiricus* антиоксидантная активность была сравнима с коммерческими препаратами корней *R. rosea* и женьшеня, но превосходила их в отношении ингибирования некоторых типов свободных радикалов.

Литература

1. Gilca M., Stoian I., Atanasiu V., Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence // J. Postgrad. Med. 2007. Vol. 53 (3). P. 207–213.
2. Polisak B., Milisav I. Aging, oxidative stress and antioxidants // Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases — A Role for Antioxidants. Intech Open Access Publisher, Croatia, 2013. P. 351–356. DOI: 10.5772/51609.
3. Packer L. et al. Oxidative stress, antioxidants, aging and disease // Oxidative Stress and Aging. Molecular and Cell Biology Updates. Birkhauser Basel, 1995. P. 1–14. DOI: 10.1007/978-3-0348-7337-61.
4. Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M. Oxidants antioxidants, and the degenerative diseases of aging // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 7915–7922.
5. Olennikov D. N., Fedorov I. A., Kashchenko N. I. et al. Khellactone Derivatives and Other Phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV Profile, and Antiobesity Potential of Dihydrosamidin // Molecules. 2019. Vol. 24 (12). P. 2286. DOI: 10.3390/molecules24122286.
6. Мальцева Е. М., Егорова Н. О., Егорова И. Н., Мухамидярова Р. А. Антиоксидантная и антирадикальная активность *in vitro* экстрактов растений *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития // Медицина в Кузбассе. 2017. Vol. 16, № 2. P. 32–38.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-75

СПОСОБ *EX VIVO* ИНДУКЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ С ВЫРАЖЕННЫМИ ИММУНОСУПРЕССИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ****EX VIVO* GENERATION OF REGULATORY B CELLS WITH BROAD-SPECTRUM IMMUNOSUPPRESSIVE CAPACITY FOR ADOPTIVE CELL THERAPY**

Э. А. Жеремян^{1,2}, А. С. Устюгова¹, Н. М. Карамушка²,
Е. М. Стасевич¹, А. Н. Уварова^{1,2}, К. В. Корнеев^{1,3}, Д. В. Купраш^{1,2}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

²Кафедра иммунологии, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

³Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Москва

E. A. Zheremyan^{1,2}, A. S. Ustiugova¹, N. M. Karamushka²,
E. M. Stasevich¹, A. N. Uvarova^{1,2}, K. V. Korneev^{1,3}, D. V. Kuprash^{1,2}

¹Center for High-Precision Editing and Genetic Technologies
for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

²Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University

³National Research Center for Hematology, Moscow

✉ elyazheremyan@mail.ru

Аннотация

Регуляторные В-лимфоциты (Bregs) обладают способностью подавлять функции эффекторных иммунных клеток при помощи разнообразных механизмов, что делает их перспективными кандидатами для адоптивной клеточной терапии при состояниях, связанных с гиперактивацией иммунного ответа. Наша работа посвящена получению функциональных Bregs из В-клеток периферической крови человека *ex vivo*.

Abstract

Regulatory B lymphocytes (Bregs) have the ability to suppress the function of effector cells using a diverse range of immunosuppressive mechanisms, making them a promising candidate for adoptive cell therapy in conditions with hyperactive immune responses. Our research focuses on generation of functional Bregs from human peripheral blood B cells *ex vivo*.

Регуляторные В-лимфоциты (Bregs) являются субпопуляцией В-клеток, обладающей выраженными иммуносупрессивными свойствами [1, 2]. Показано непосредственное участие Bregs в патогенезе ревматоидного артрита, псориаза, рассеянного склероза, диабета I типа, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, миокардита, аллергии, бактериальных и вирусных инфекций, онкологических заболеваний, а также реакции «трансплантат против хозяина» [3–5]. Они обладают уникальным спектром механизмов иммуносупрессии, как при помощи растворимых факторов (IL10, IL35, TGF β , гранзима В), так и поверхностных молекул (PD-L1, FasL, CD39, CD73) [6–12]. Такой широкий репертуар механизмов иммуносупрессии делает Bregs привлекательным инструментом для адоптивной клеточной терапии заболеваний, связанных с избыточной активацией иммунных реакций. Основным ограничением для развития подобных подходов является малочисленность и крайне низкая выживаемость Bregs, что характерно для всех первичных культур В-клеток.

CD19⁺ В-лимфоциты были выделены из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров методом магнитной сепарации. В-клетки культивировались в полной среде RPMI-1640, дополненной рекомбинантным CD40L (1 мкг/мл), IL21 (25 нг/мл) и CpG (2 мкМ, ODN2006), в течение 7 дней, при этом для определения уровня пролиферации использовалась окраска CellTraceViolet. Клетки были окрашены антителами к основным фенотипическим молекулярным маркерам Bregs (CD24, CD27, CD38) и затем анализировались методом проточной цитометрии. Активация с помощью CD40L, CpG и IL21 увеличивала пролиферацию основных субпопуляций Bregs в периферической крови человека: Bregs памяти (CD24^{hi}CD27⁺) и транзиторных Bregs (CD24^{hi}CD38^{hi}). Мы оценили продукцию IL10 активированными В-лимфоцитами с помощью ИФА, а также экспрессию в них провоспалительных генов *CD274* (кодирующего PD-L1) и *EBI3* (кодирующего IL27B — общую субъединицу

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00398.

цитокинов IL35 и IL27) с помощью количественного ПЦР в реальном времени. Все три противовоспалительных фактора были высоко экспрессированы В-клетками, обработанными CD40L + CpG + IL21, в сравнении с неактивированным контролем, что делает эту комбинацию стимулов наиболее эффективной в индукции иммуносупрессивного ответа.

Литература

1. Inoue S., Leitner W.W., Golding B., Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66. P. 7741–7747.
2. Sarvaria A., Madrigal J.A., Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol.* 2017. Vol. 14. P. 662–674.
3. Wu H., Su Z., Barnie P.A. The role of B regulatory (B10) cells in inflammatory disorders and their potential as therapeutic targets // *Int. Immunopharmacol.* 2020. Vol. 78. P. 106111.
4. Jansen K., Cevhertas L., Ma S. et al. Regulatory B cells, A to Z // *Allergy.* 2021. Vol. 76. P. 2699–2715.
5. Yanaba K., Kamata M., Ishiura N. et al. Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation // *J. Leukoc. Biol.* 2013. Vol. 94. P. 563–573.
6. Catalán D., Mansilla M.A., Ferrier A. et al. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 611795.
7. Zheremyan E.A., Ustiugova A.S., Radko A.I. et al. Novel Potential Mechanisms of Regulatory B Cell-Mediated Immunosuppression. *Biochemistry.* 2023. Vol. 88. P. 13–21.
8. Nouël A., Pochard P., Simon Q. et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner // *J. Autoimmun.* 2015. Vol. 59. P. 53–60.
9. Shen P., Roch T., Lampropoulou V. et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases // *Nature.* 2014. Vol. 507. P. 366–370.
10. Xu L., Liu X., Liu H. et al. Impairment of Granzyme B-Producing Regulatory B Cells Correlates with Exacerbated Rheumatoid Arthritis // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 768.
11. Figueiró F., Muller L., Funk S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg) // *Oncoimmunology.* 2016. Vol. 5. P. e1082703.
12. Kaku H., Cheng K.F., Al-Abed Y., Rothstein T.L. A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production // *J. Immunol.* 2014. Vol. 193. P. 5904–5913.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-76

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ALOX15 НА ОСНОВЕ ЛИГАНДОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РАЗНОНАПРАВЛЕННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ЛИНОЛЕВОЙ И АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТ*

ALLOSTERIC INHIBITORS OF ALOX15 BASED ON LIGANDS PROVIDING MULTIDIRECTIONAL REGULATION OF LINOLEIC AND ARACHIDONIC ACIDS

А. М. Журавлев, В. В. Аксенов, В. Н. Гаврилюк, А. Б. Голованов, И. В. Иванов

Московский государственный университет тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова

A. M. Zhuravlev, V. V. Aksenov, V. N. Gavrilyuk, A. B. Golovanov, I. V. Ivanov

Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies

✉ alekszhur95@yandex.ru

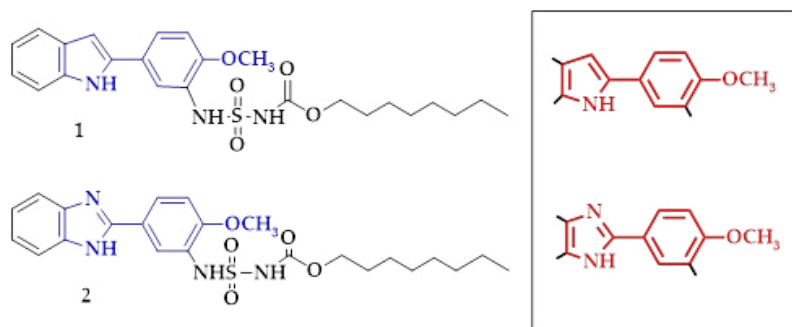
Аннотация

15-липоксигеназы млекопитающих (ALOX15) являются ферментами перекисного окисления липидов. Патологическая роль метаболитов ALOX15, производных линолевой и арахидоновой кислот, сделала этот фермент мишенью для фармакологических исследований. Несколько производных индола и бензимидазола ингибируют активность ALOX15 субстратспецифичным образом, но молекулярная основа этого аллостерического ингибирования остается неясной.

Abstract

Mammalian 15-lipoxygenases (ALOX15) are enzymes of lipid peroxidation. The pathophysiological role of ALOX15 metabolites, linoleic acid and arachidonic acid derivatives, has made this enzyme a target for pharmacological studies. Several indole and benzimidazole derivatives inhibit the activity of ALOX15 in a substrate-specific manner, but the molecular basis of this allosteric inhibition remains unclear.

15-липоксигеназы млекопитающих (ALOX15) представляют собой ферменты перекисного окисления липидов, которые проявляют различную функциональность в различных моделях рака и воспаления. Патологическая роль метаболитов ALOX15, полученных из линолевой и арахидоновой кислот, сделала эти ферменты объектом фармакологических исследований. Функционирование данной группы ферментов подвергается аллостерической регуляции, но молекулярная основа этого эффекта является до сих пор малоизученной. В ряде исследований на моделях ALOXs млекопитающих были предложены места локализации аллостерических сайтов для связывания лиганда и/или ингибитора, которые отличаются от каталитического центра связывания фермента. В качестве альтернативы также был представлен механизм, который предусматривает межмолекулярные взаимодействия между двумя мономерами в димере ALOX15. В данной работе мы пытаемся определить общий фармакофор, который имеет решающее значение для этого аллостерического ингибирования.



Структуры субстратспецифичных ингибиторов ALOX15 для изучения их взаимосвязи структура — активность. Левая панель — подробные структуры выбранных соединений, правая панель — общая фармакофорная группа

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № F5FZ-2023-0004.
© А. М. Журавлев, В. В. Аксенов, В. Н. Гаврилюк, А. Б. Голованов, И. В. Иванов, 2023

Чтобы проверить справедливость нашей гипотезы, октил (N-(5-(1H-индол-2-ил)-2-метоксифенил)сульфамойл)карбамат (1) был получен в соответствии с процедурой, описанной нами ранее [1]. Октил (N-(5-(1H-бензо[d]имидазол-2-ил)-2-метоксифенил)сульфамойл)карбамат (2) был получен из анисового альдегида и о-фенилендиамин, что требует условий автоокисления или присутствия различных катализаторов. В ходе проведения исследований мы обнаружили, что замещенные бензимидазолы вызывают более слабые ингибирующие эффекты по сравнению с производными индола. Эти данные были подтверждены с помощью кинетических исследований. Наличие в структуре фармакофоров MeO-арильного фрагмента обеспечивает жесткое связывание ингибитора в активном центре фермента. Эти данные значимы, поскольку субстрат-специфические ингибиторы необходимы для выяснения роли различных метаболитов ALOX15, которые, в свою очередь, синтезируются биохимическим путем из различных полиненасыщенных жирных кислот у млекопитающих.

Литература

1. Golovanov A., Zhuravlev A., Cruz A. et al. N-Substituted 5-(1H-Indol-2-yl)-2-methoxyanilines are allosteric inhibitors of the linoleate oxygenase activity of selected mammalian ALOX15 orthologs: Mechanism of action // J. Med. Chem. 2022. Vol. 65. P. 1979–1995.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-77

**ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-МАТРИЦЫ ДЛЯ НАРАБОТКИ мРНК, КОДИРУЮЩЕЙ RBD БЕЛКА
S ВИРУСА SARS-COV-2 OMICRON BA.2***

**CONSTRUCTION OF A DNA TEMPLATE FOR THE PRODUCTION OF MRNA ENCODING RBD
OF THE S PROTEIN OF THE SARS-COV-2 OMICRON BA.2 VIRUS**

А. М. Задорожный, С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

A. M. Zadorozhny, S. V. Sharabrin, A. P. Rudometov, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ zadorozhnyy_am@vector.nsc.ru

Аннотация

Работа посвящена конструированию ДНК-матриц для *in vitro* наработки мРНК, кодирующих рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2 (Omicron BA.2). Получены три плазмиды ДНК-матрицы, кодирующие ген белка RBD, но отличающиеся тем, что они несут разные 5'НТО и 3'НТО. Выбран вариант ДНК-матрицы, обеспечивающий синтез таких мРНК-RBD, которые наиболее эффективно индуцируют синтез белка RBD в эукариотических клетках.

Abstract

The work is devoted to the construction of DNA templates for *in vitro* production of mRNAs encoding the receptor-binding domain (RBD) of the S protein of the SARS-CoV-2 virus, the genetic variant Omicron BA.2. Three plasmids DNA templates were obtained that encode the RBD protein gene, but differ in that they carry different 5'UTRs and 3'UTRs. A variant of the DNA template was chosen, which provides the synthesis of mRNA-RBD most effectively expressed in eukaryotic cells.

Одним из наиболее перспективных подходов к созданию вакцин против вируса SARS-CoV-2 является создание вакцинных конструкций на основе мРНК. Это обусловлено рядом причин: во-первых, существенным преимуществом мРНК-вакцин является быстрое, недорогое, масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*; во-вторых, благодаря возможности легко проводить замену целевого гена в мРНК-вакцине, не изменяя технологию производства, появляется возможность быстро реагировать на появление новых штаммов вируса; в-третьих, они стимулируют обе ветви иммунного ответа, гуморальную и клеточно-опосредованную. Однако даже актуальные и разрешенные к применению мРНК-вакцины против вируса SARS-CoV-2 могут быть оптимизированы или улучшены [1, 2]. Поэтому работа по созданию новых конструкций продолжается.

ДНК-матрица является критически важным компонентом для получения мРНК-вакцин. Важный компонент для получения мРНК матричным синтезом — промотор фага T7, с которого будет происходить синтез РНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Именно в матрице закладываются генетическая последовательность белка-антигена, который будет синтезироваться на рибосомах в эукариотических клетках, и регуляторные 5' и 3' нетранслируемые регионы (НТО), необходимые для эффективной трансляции белка и повышения стабильности РНК. Кроме этого, матрица может нести в себе другие структурные элементы мРНК, позволяющие ускорить производство вакцины, такие как возможность котранскрипционного экзирования и встроенный поли-А хвост [1, 3, 4].

Цели работы — получение ДНК-матрицы для наработки мРНК, кодирующей RBD Omicron BA.2, и оценка влияния различных НТО на синтез белка с синтезированных *in vitro* мРНК.

В ходе работы участок гена белка S вируса SARS-CoV-2, кодирующий рецептор-связывающий домен варианта Omicron BA.2, был клонирован в составе трех различных плазмид (Cassette), которые различались тем, что содержали разные НТО. Выбор НТО был сделан по следующему принципу: среди известных генов выбирали те, которые обеспечивали высокоэкспрессируемые и стабильные мРНК. Были выбраны НТО генов α - и β -глобина человека и гена альфа-цепи цитохрома b-245 (CYBA). Конструкции были названы соответственно Cas1-RBD-OM, Cas2-RBD-OM и Cas3-RBD-OM. Подлинность полученных ДНК-конструкций была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
© А. М. Задорожный, С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, 2023

ДНК-матрицы были использованы для *in vitro* наработки мРНК. Синтез РНК проводили с использованием соответствующей линейаризованной и очищенной ДНК-матрицы и набора для высокоэффективного синтеза РНК *in vitro* (BioLabMix), согласно протоколу производителя. Успешность транскрипции подтверждали электрофорезом в 2%-м агарозном геле. Для оценки эффективности синтеза целевого белка полученными вариантами мРНК-RBD были трансфицированы клетки HEK293 с помощью Lipofectamine 3000, согласно инструкции производителя. После этого собирали культуральную жидкость и проводили определение количества секретируемого белка RBD с помощью сэндвич-ИФА с использованием антител к RBD. Был выбран вариант ДНК-матрицы, обеспечивающий синтез таких мРНК-RBD, которые наиболее эффективно индуцируют синтез белка RBD в эукариотических клетках.

Литература

1. Xia X. Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines // *Vaccines*. 2021. Vol. 9, № 7. P. 734.
2. Karpenko L. I., Rudometov A. P., Sharabrin S. V. et al. Delivery of mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 Using a Polyglucin:Spermidine Conjugate. *Vaccines (Basel)*. 2021. Vol. 9 (2). P. 76. DOI: 10.3390/vaccines9020076.
3. Litvinova V. R. et al. mRNA Vaccine Platform: mRNA Production and Delivery // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2023. Vol. 49, № 2. P. 220–235.
4. Weissman D. mRNA transcript therapy // *Expert review of vaccines*. 2015. Vol. 14, № 2. P. 265–281.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-78

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК *E. COLI* ВО ВРЕМЯ ФЕРМЕНТАЦИИ****USING FLOW CYTOMETRY TO ASSESS THE VIABILITY OF *E. COLI* CELLS DURING FERMENTATION**

А. К. Зенкова¹, А. Д. Акино^{1,2}, М. Д. Бочкарева¹, И. А. Корнаков¹,
Д. А. Гречко¹, А. С. Попова¹, К. А. Воронкова¹, З. Р. Хасаншина¹

¹ЗАО «Фарм-Холдинг» (R&D центр компании «Герофарм»), Санкт-Петербург

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

A. K. Zenkova¹, A. D. Aquino^{1,2}, M. D. Bochkareva¹, I. A. Kornakov¹,
D. A. Grechko¹, A. S. Popova¹, K. A. Voronkova¹, Z. R. Khasanshina¹

¹Pharm-Holding, CJSC (Geropharm R&D Center), Saint Petersburg

²Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg

✉ arina.zenkova@geropharm.com

Аннотация

Разработка эффективных условий культивирования имеет решающее значение для производства рекомбинантных белков терапевтического применения. Ключевой отклик при оптимизации условий культивирования — снижение доли клеток, находящихся в состоянии лизиса и ALD. В данной работе разработан метод проточной цитометрии для оценки клеточного цикла *E. coli* в реальном времени в процессе культивирования в биореакторах.

Abstract

The development of efficient cultivation condition is crucial for industrial production of recombinant proteins of therapeutic importance. The key response in optimizing culture conditions is to reduce the proportion of lysed cells and ALD cells. In this work, a flow cytometry method was developed to evaluate the *E. coli* cell cycle in real time during cultivation in bioreactors.

Лизис бактериальных клеток часто наблюдается на поздних стадиях культивирования. Традиционно лизис клеток считают следствием «несбалансированного роста» на конечной стадии жизненного цикла бактерий. На жизнеспособность *E. coli* при бактериальной ферментации может влиять множество факторов, включая условия окружающей среды в ферментере.

Кроме того, у бактерий выделяют апоптозоподобное состояние или ALD (apoptosis-like death), которое характеризуется нарушением мембранного потенциала, деполяризацией мембраны, перемещением фосфатидилсерина на внешний слой мембраны, а также фрагментацией ДНК. Данные процессы характерны для клеточной гибели [1].

Одним из способов мониторинга состояния клеток во время ферментации является использование метода проточной цитометрии. Проточная цитометрия имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными микробиологическими анализами, такими как посев с разведением. Благодаря многоцветному анализу можно оценить физиологическое состояние отдельной микробной клетки в «реальном времени». Метод позволяет одновременно оценивать наличие повреждений цитоплазматической мембраны, механизмы транспорта через нее и белки в ее составе. Наличие как интактной поляризованной цитоплазматической мембраны, так и активных транспортных систем через мембрану необходимо для полноценной «здоровой» клетки [2].

Цель исследования — разработать методику определения жизнеспособности бактериальных клеток в процессе ферментации с использованием проточной цитометрии.

Материалы и методы

В проведенном исследовании для определения лизированных клеток и ALD использовали комбинацию флуоресцентных красителей. В частности, экстернализация фосфатидилсерина, наблюдаемая при ALD, была обнаружена с помощью окрашивания Annexin V, а лизированные клетки (клетки с поврежденной мембраной) определяли с помощью окраски Propidium iodide [3]. Были поставлены отрицательные (неокрашенные клетки) и положительные (клетки, обработанные H₂O₂ или инкубированные при 95 °С) контроли. Для формирования

матрицы компенсации также были поставлены контроли с окраской только пропидием йодидом (PI) и только Аннексином V. Обработка данных с проточного цитометра проводилась с помощью CytExpert 2.4 Software. Для статистической обработки данных использовалась GraphPad Prism 8 Software.

Результаты

Процент лизированных клеток и ALD закономерно увеличивался с увеличением времени ферментации, что можно увидеть на графике (рис. 1).

В ходе экспериментов были проанализированы пробы из шести биореакторов с разными параметрами культивирования на 16-й час ферментации. Процент лизированных клеток находился в диапазоне от 0,5–3 %, следовательно, в процессе ферментации не происходит выраженного лизиса клеток *E. coli*. Однако наблюдается изменение ALD в зависимости от условий культивирования. При оптимальных условиях ферментации в ферментере 7 процент ALD составил 4,16 %, а процент клеток, погибших путем лизиса, — 1 %. Данные представлены на гистограмме (рис. 2).

Результаты, полученные по итогам эксперимента, представляют практическую ценность для этапов разработки условий культивирования штаммов-продуцентов терапевтических белков.

Таким образом, использование проточной цитометрии для анализа жизнеспособности клеток *E. coli* представляет собой ценный метод оценки влияния параметров ферментации и компонентов питательной среды на физиологическое состояние клеток. Работы по применению данного метода продолжают. Проводятся дальнейшие стандартизация и валидация методики.

Литература

1. Hewitt C. J. et al. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration // *Biotechnology and bioengineering*. 2000. Vol. 70, № 4. P. 381–390.

2. Want A. et al. Studies related to antibody fragment (Fab) production in *Escherichia coli* W3110 fed-batch fermentation processes using multiparameter flow cytometry // *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009. Vol. 75, № 2. P. 148–154.

3. Lewis G. et al. The application of multi-parameter flow cytometry to the study of recombinant *Escherichia coli* batch fermentation processes // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004. Vol. 31, № 7. P. 311–322.

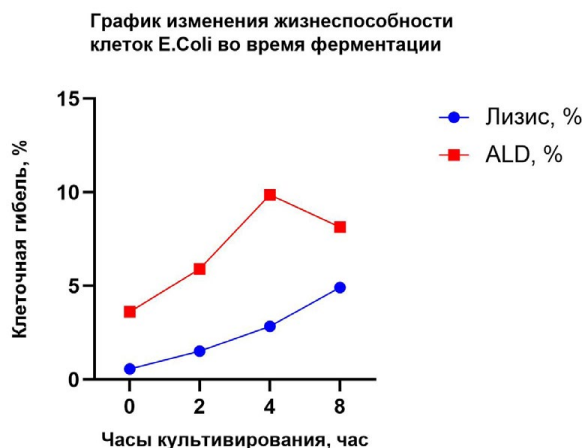


Рис. 1. График процентного содержания лизированных клеток и клеток в состоянии ALD во время ферментации

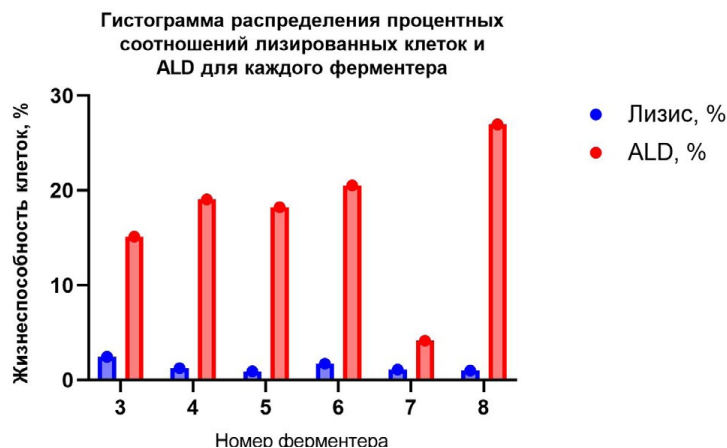


Рис. 2. Гистограмма распределения процентных соотношений лизированных клеток и ALD для каждого ферментера

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-79

БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НЕФТЕПРОМЫСЛОВЫХ ВОД РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН*

BACTERIAL DIVERSITY OF OILFIELD WATERS OF THE REPUBLIC OF TATARSTAN

Э. Э. Зиганшина, А. М. Зиганшин

Казанский федеральный университет

E. E. Ziganshina, A. M. Ziganshin

Kazan Federal University

✉ elvira.ziganshina@kpfu.ru

Аннотация

В нефтепромысловых водах, ввиду ряда экологических факторов, представлены особые микробные сообщества. В настоящей работе проанализировано бактериальное разнообразие образцов нефтепромысловых вод Республики Татарстан (Россия). Объектами исследований были культивируемые бактерии пластовых и нагнетательных вод. Бактериальные сообщества нефтепромысловых вод были представлены членами фил *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*.

Abstract

Oilfield waters are characterized by distinct microbial communities due to several environmental factors. In this work, the bacterial diversity of oilfield water samples of the Republic of Tatarstan (Russia) was analyzed. The objects of research were bacterial cultures from formation and injection waters. The bacterial communities in oilfield waters were represented by members of the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria*.

Микроорганизмы, ассоциированные с нефтяными пластами, резервуарами, нефтепроизводственными водами, являются экстремофилами, поскольку способны существовать и расти в средах с высокой температурой, давлением и соленостью [1, 2]. С одной стороны, данные микроорганизмы являются важным резервуаром ферментов и интересны для внедрения в различные биотехнологии. С другой стороны, разнообразие и активность микробных сообществ данных систем напрямую или косвенно влияет на качество добываемой нефти. Так, активность отдельных представителей микробных сообществ влияет на плотность и вязкость нефти, что применяется в биотехнологиях по повышению нефтеотдачи [3], тогда как другие представители, участвуя в коррозии, несут угрозу инфраструктуре добычи, транспортировки и переработки нефти и нефтепродуктов [4]. Описано большое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с объектами нефтяной отрасли, среди которых детектируются сульфатредуцирующие прокариоты, бактерии, продуцирующие органические кислоты, а также метаногенные археи [1–5]. Данные микроорганизмы и их метаболизм представляют как научный, так и практический интерес, но сегодня знания о микробной экологии в нефтяных системах все еще ограничены.

В работе проанализированы образцы нефтепромысловых вод месторождений Республики Татарстан (Россия). Были отобраны образцы пластовой жидкости из различных скважин, эксплуатирующих залежи девона и карбона, а также воды нагнетательные (очищенные воды, закачиваемые в нагнетательные скважины). Далее были определены основные физико-химические характеристики проб. С использованием универсальных и элективных питательных сред получены накопительные и чистые культуры аэробных и анаэробных бактерий. При идентификации чистых культур бактерий в качестве маркера использовали ген 16S рибосомальной РНК бактерий.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК изолированных бактериальных культур позволил отметить наличие бактерий трех основных фил: *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Среди важных групп бактерий были отмечены представители, принадлежащие семействам *Bacillaceae*, *Desulfotomaculaceae*, *Marinobacteraceae*, *Halomonadaceae*, а также *Micrococccaceae*. Несмотря на наличие общих таксонов, были отмечены различия в составе исследуемых объектов, что можно объяснить различиями физико-химических характеристик образцов и экологическими условиями. Отмечено относительно низкое распространение культивируемых фило типов в отдельных образцах, что может быть связано как с условиями среды, так и с применением антикоррозионных агентов. Стоит отметить, что несмотря на то, что культивируемые методы исследования позволяют получать данные, важные для оценки разнообразия изучаемых экосистем и метаболического потенциала природных микробных сообществ, они не позволяют отразить истинное разнообразие и долю видов в образцах.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-24-00364.

© Э. Э. Зиганшина, А. М. Зиганшин, 2023

Отдельные представители бактериальных сообществ изученных образцов были также обнаружены и в других нефтяных месторождениях и отмечены как важные участники биогеохимический циклов [1–5]. Таким образом, идентификация микроорганизмов, ассоциированных с образцами нефтяной отрасли, позволит расширить знания о разнообразии и метаболизме микроорганизмов экстремофильного образа жизни, что позволит использовать их особенности для различных биотехнологий.

Литература

1. Li H., Yang S., Mu B. et al. Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oilfield // *FEMS Microbiology Ecology*. 2007. Vol. 60. P. 74–84.
2. Pannekens M., Kroll L., Müller H. et al. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms // *New Biotechnology*. 2019. Vol. 25. P. 1–9.
3. Niu J., Liu Q., Lv J., Peng B. Review on microbial enhanced oil recovery: Mechanisms, modeling and field trials // *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2020. Vol. 192. P. 107350.
4. Vigneron A., Alsop E. B., Chambers B. et al. Complementary microorganisms in highly corrosive biofilms from an offshore oil production facility // *Applied and Environmental Microbiology*. 2016. Vol. 82. P. 2545–2554.
5. Lenchi N., Inceoglu O., Kebbouche-Gana S. et al. Diversity of microbial communities in production and injection waters of Algerian oilfields revealed by 16S rRNA gene amplicon 454 pyrosequencing // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. P. e66588.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-80

ПРОДУКТИВНОСТЬ ХЛОРЕЛЛЫ ПРИ РОСТЕ НА СТОКАХ БЫТОВЫХ ВОД*
PRODUCTIVITY OF *CHLORELLA* DURING GROWTH IN DOMESTIC WASTEWATER

Э. Э. Зиганшина, С. С. Булынина, А. М. Зиганшин

Казанский федеральный университет

E. E. Ziganshina, S. S. Bulynina, A. M. Ziganshin

Kazan Federal University

✉ elvira.ziganshina@kpfu.ru

Аннотация

Раскрытие структуры бактериальных сообществ сточных вод, являющихся альтернативной средой роста микроводорослей, необходимо для повышения качества водорослевой продукции. Результаты исследования позволили отметить стабильность роста *Chlorella sorokiniana* в ряде нестерильных бытовых сточных вод как с точки зрения биоремедиации, так и в отношении производства ценных продуктов.

Abstract

Uncovering the structure of bacterial communities in wastewater, which is an alternative growth medium for microalgae, is necessary to improve the quality of algal products. The results of the work indicate the sustainability of the growth of *Chlorella sorokiniana* in distinct non-sterile domestic wastewaters, both in terms of bioremediation and the production of valuable products.

Микроскопические водоросли, как и цианобактерии, являются фотосинтезирующими микроорганизмами с высоким биоразнообразием. Благодаря своей фотосинтетической активности данные микроорганизмы играют важную роль в биологической секвестрации углекислого газа и круговороте питательных веществ [1]. Метаболическая пластичность, быстрый рост и способность адаптироваться к различным условиям окружающей среды позволили внедрить отдельные микроскопические водоросли в различные биотехнологии. Так, за последние десятилетия микроводоросли стали основой многомиллионной индустрии. Благодаря высокому содержанию в биомассе полисахаридов, белков, липидов, антиоксидантов и витаминов водоросли культивируются для производства кормов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных и аквакультуры, товаров для здоровья и косметики, а также для отрасли биоэнергетики [2].

Сегодня в мире активно рассматривается культивирование перспективных микроводорослей на различных жидких отходах, стоках, что позволяет снизить как нагрузку на окружающую среду, так и затраты на культивирование. Стоит отметить, что снижение затрат является ключом к коммерциализации водорослевой продукции и использование сточных вод в качестве питательной среды является достойной альтернативой дорогим синтетическим средам. Несмотря на то, что микроводоросли выстраивают тесные экологические взаимоотношения с бактериями в естественной водной среде, их взаимоотношения в инженерных системах очистки сточных вод представляют собой ключевой фактор, влияющий на продуктивность водорослей [3].

В настоящей работе культивирование пресноводной микроводоросли вида *Chlorella sorokiniana* в нестерильных водах септических систем (после удаления взвешенных частиц) было проанализировано по трем аспектам: способность к накоплению биомассы, утилизация основных загрязнителей воды и оценка структуры культивируемых бактериальных сообществ сточных вод. Культивирование водоросли в сточных водах проводили в лабораторном реакторе BIOSTAT A plus (Sartorius, Германия) с рабочим объемом 5,0 л, со светодиодными лампами. Интенсивность освещенности, температура, уровень pH, поток CO₂, степень аэрации, уровень макроэлементов были заданы на основе ранних работ [4, 5]. В работе оценены характеристики роста и продуктивности водоросли, а также определена структура бактериальных сообществ исходных сточных вод.

При культивировании в отдельных сточных водах водоросль успешно накапливала богатую белком биомассу и снижала концентрацию загрязняющих веществ. Результаты анализа последовательности гена бактериальной 16S рРНК изолированных бактериальных культур показали, что несмотря на различные источники, сточные воды изначально характеризовались схожими флотипами, но в разных пропорциях. Бактерии фило

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ и Кабинета министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 22-24-20044.

Proteobacteria составили большинство изолятов сточных вод из различных септиков. Обильными классами бактерий сточных вод были *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Внутри данных классов были отмечены бактерии родов *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Phyllobacterium* и *Stenotrophomonas*. Стоит отметить, что бактерии рода *Stenotrophomonas* имеют большой потенциал для применения в биотехнологиях и могут выступать полезными партнерами водорослей при очистке сточных вод. Результаты работы согласуются с работами, отмечающими эффективное использование микроводорослей для биологической очистки сточных вод в сочетании с производством ценной водорослевой биомассы [3, 5]. Новые данные о структуре бактериальных сообществ сред роста водорослей на основе сточных вод позволят как контролировать, так и повысить качество водорослевой биомассы и ценных продуктов их метаболизма.

Литература

1. Li G., Xiao W., Yang T., Lyu T. Optimization and process effect for microalgae carbon dioxide fixation technology applications based on carbon capture: a comprehensive review // C-Journal of Carbon Research. 2023. Vol. 9. P. 35.
2. Fernandez F. G. A., Reis A., Wijffels R. H. et al. The role of microalgae in the bioeconomy // New Biotechnology. 2021. Vol. 61. P. 99–107.
3. Wirth R., Pap B., Bojti T. et al. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: microalgae-bacteria interactions during nutrient removal // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020. Vol. 8. P. 557572.
4. Ziganshina E. E., Bulynina S. S., Ziganshin A. M. Comparison of the photoautotrophic growth regimens of *Chlorella sorokiniana* in a photobioreactor for enhanced biomass productivity. Biology. 2020. Vol. 9. P. 169.
5. Ziganshina E. E., Bulynina S. S., Ziganshin A. M. Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in a photobioreactor during the utilization of different forms of nitrogen at various temperatures // Plants. 2022. Vol. 11. P. 1086.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-81

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА,
ОБЛАДАЮЩИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ
В ОТНОШЕНИИ SARS-COV-2 ВАРИАНТОВ DELTA И OMICRON***

**RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODIES WITH VIRUS NEUTRALIZING ACTIVITY
AGAINST SARS-COV-2 DELTA AND OMICRON VARIANTS**

А. А. Зимонина, Е. Ю. Прудникова, А. Р. Иматдинов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

A. A. Zimonina, E. Yu. Prudnikova, A. R. Imatdinov

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ zimonina_aa@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе описаны получение и характеристика рекомбинантных человеческих моноклональных антител, взаимодействующих с рецептор-связывающим доменом гликопротеина Spike и обладающих вируснейтрализующей активностью в отношении SARS-CoV-2 вариантов Delta и Omicron.

Abstract

The study describes the production and characterization of recombinant human monoclonal antibodies interacting with the receptor-binding domain of the Spike glycoprotein and possessing virus-neutralizing activity against SARS-CoV-2 variants Delta and Omicron.

По данным Всемирной организации здравоохранения на 23 июля 2023 г. зарегистрировано более 768 млн подтвержденных случаев заболевания COVID-19 и более 6,95 млн летальных исходов [1].

Геном бетакоронавируса SARS-CoV-2 представляет собой (+)-оцРНК длиной ~ 30 тыс. рибонуклеотидов, вирион имеет сферическую форму (100–140 нм) и состоит из заимствованной у инфицированной клетки билипидной мембраны, а также структурных белков: гликопротеина S (Spike), белка E, мембранного белка M и нуклеопротеина N [2]. Показано, что иммуноглобулины на рецептор-связывающий домен (RBD) в S1 субъединице трансмембранного гликопротеина Spike проявляют вируснейтрализующие свойства, предотвращая взаимодействие вирионов SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2 [2]. В то же время накопление мутаций в RBD, вызванное адаптационной изменчивостью вируса SARS-COV-2, приводит к появлению новых вариантов, а также к снижению нейтрализующей активности ранее отобранных антител. Получение моноклональных антител (МКА) с перекрестной вируснейтрализующей активностью к нескольким актуальным вариантам SARS-CoV-2 или использование комбинации антител (коктейлей), взаимодействующих с консервативными последовательностями рецептор-связывающего домена, позволит снизить вероятность потери нейтрализующей активности разрабатываемых препаратов на основе МКА.

Цель работы — получение и характеристика рекомбинантных моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении SARS-CoV-2 вариантов Delta и Omicron.

Фрагменты кДНК, кодирующие вариабельные домены антител легкой и тяжелой цепей, амплифицировали из изолированных RBD-специфичных В-лимфоцитов донора-реконвалесцента COVID-19. Фрагменты кДНК, кодирующие вариабельные домены антител, объединяли с кодон-оптимизированными константными последовательностями, кодирующими тяжелую цепь (IgG1) и легкую цепь: каппа (каппа, κ) или лямбда (lambda, λ). Полученные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов последовательно клонировали по уникальным сайтам в интеграционном экспрессирующем векторе SB7G_HIGH. Корректность нуклеотидных последовательностей рекомбинантных плазмид подтверждали секвенированием по методу Сэнгера.

Для создания клеточных линий, стабильно экспрессирующих полноразмерные рекомбинантные человеческие антитела, проводили котрансфекцию клеток CHO-S полученными рекомбинантными плазмидами совместно с конструкцией SB100X, экспрессирующей транспозазу Sleeping Beauty (SB). Геном-интегрированные

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

клетки-трансформанты CHO-S отбирали методом селекции пурамицином (InVivoGen; 50 мкг/мл) в течение 7–14 дней.

Аффинную хроматографическую очистку МКА проводили на системе АКТА Pure 150M с использованием колонок, упакованных сорбентом MabSelect SuRe (Cytiva, США).

Первичную характеристику хроматографически очищенных МКА проводили методом SDS-PAGE электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. В невосстанавливающих условиях ориентировочная молекулярная масса составила 145–150 кДа, а в восстанавливающих условиях выявлено по два мажорных бенда на 23–25 кДа и 50–55 кДа, что соответствует легким и тяжелым цепям иммуноглобулинов после восстановления дисульфидных связей между ними.

Специфичность рекомбинантных МКА анализировали методами вестерн-блоттинга и ТФ ИФА с использованием рекомбинантного антигена RBD Delta (AtaGenix Laboratories, КНР), а также инактивированного антигена SARS-CoV-2. Показано, что все исследованные МКА высокоспецифичны в отношении рекомбинантного и нативного антигенов.

Вируснейтрализующую активность МКА исследовали методом вируснейтрализации, для этого вирусный материал SARS-CoV-2 варианта Delta или Omicron (3750 ТЦД₅₀ на лунку) инкубировали 1 ч при 37 °С с разведениями иммуноглобулинов, затем вносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета с монослоем пермисивной клеточной линии Vero E6. Выявление репродукции вируса SARS-CoV-2 проводили через 48 ч после инфицирования методом иммуноцитохимии с использованием моноклональных антител к антигенам N и S (AtaGenix Laboratories, КНР). Результаты выражали в концентрации иммуноглобулинов, подавляющих репродукцию вируса на 50 и 99 % относительно контролей (IC50 и IC99).

В результате скрининговых исследований для дальнейшей работы отобраны полноразмерные рекомбинантные человеческие антитела DEV_K51, DEV_K55, DEV_K57, DEV_K61, обладающие выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении вариантов Delta и Omicron вируса SARS-CoV-2.

Литература

1. Weekly epidemiological update on COVID-19 — 27 July 2023. Edition 153. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---27-july-2023>.
2. Wang Z. et al. Characterization of RBD-specific cross-neutralizing antibodies responses against SARS-CoV-2 variants from COVID-19 convalescents // *Frontiers in Immunology*. 2023. Vol. 14. P. 1160283.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-82

**ИСКУССТВЕННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ
ИЗ Т-КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ ИНДУКЦИИ*****ARTIFICIAL VESICLES OBTAINED FROM T CELLS BY VARIOUS INDUCTION METHODS**Е. А. Змиевская¹, С. А. Мухаметшин¹, Е. Т. Сираева¹, М. П. Кутырева², А. А. Ханнанов², Э. Р. Булатов¹¹*Институт биологии и фундаментальной медицины, Казанский федеральный университет*²*Химический институт им. А. М. Бутлерова, Казанский федеральный университет*E. A. Zmievskaia¹, S. A. Mukhametshin¹, E. T. Siraeva¹, M. P. Kutyreva², A. A. Khannanov², E. R. Bulatov¹¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University*²*Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University*

✉ bulatovemil@gmail.com

Аннотация

Клеточная терапия — это передовая ветвь биомедицины. Проблемы с широким клиническим применением данных препаратов могут быть решены с помощью внеклеточных везикул (ВВ) как бесклеточного аналога. Центральным препятствием для внедрения ВВ является низкий выход продукта. В исследовании мы оценили цитохалазин В как химический индуктор и ультразвук как физический индуктор искусственных везикул (ИВ) из первичных Т-клеток и клеточной линии SupT1.

Abstract

Cellular therapy is a promising branch of biomedicine. Problems with the effectiveness and safety of these therapy can be solved by using extracellular vesicles (EV) as a cell-free modality. One of the main obstacles for technology is low yield. In a study, we tested cytochalasin B as a chemical inducer and ultrasound as a physical inducer of artificial vesicles (AVs) from primary T cells and the SupT1 cell line.

Введение

Внеклеточные везикулы (ВВ) секретируются большинством клеток организма. Их активно изучают как бесклеточные аналоги в контексте иммунотерапии отдельными популяциями Т-клеток (Т-рег или ЦТЛ) или генетически модифицированными Т-клетками. Методы индукции искусственных везикул (ИВ) из Т-клеток малоизучены, в то время как большинство исследований, как правило, основано на естественно секретируемых ВВ. В то же время многие способы индукции образования везикул изучаются вне данного контекста — естественная секреция, стрессовое воздействие или даже разрушение клеток, для повышения эффективности их образования.

Материалы и методы

Были протестированы два метода индукции ИВ: цитохалазин В (ЦхВ) и ультразвуковая обработка (УЗ) в сочетании с активацией Т-клеток антителами к CD3/CD28 или без таковой. ИВ, индуцированные из первичных Т-клеток, изучали с помощью анализа траектории наночастиц (АТН) (NanoSight LM10, Malvern), визуализировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) (Dimension FastScan, Bruker), с помощью вестерн-блоттинга оценили количество функционально важных белков Т-клеток (CD3, HLAII, Гранзим В). Для ИВ, индуцированных из клеточной линией SupT1, проводили флуорометрический анализ и вестерн-блоттинг для оценки переноса различных клеточных компонентов (ядра, цитоплазмы, эндоплазматического ретикулума) из родительских клеток.

Результаты

По результатам АТН ЦхВ позволил получить ИВ с выходом, сравнимым с выходом естественной секреции. Только УЗ продуцировал ИВ на уровне, аналогичном активации, а обработка ультразвуком в сочетании с активацией приводила к 7-кратному увеличению выхода ИВ по сравнению с естественными ВВ. Оба метода индукции привели к получению более однородной популяции ИВ с меньшей дисперсией и меньшим средним размером, чем естественные ВВ в целом. АСМ продемонстрировала соответствие результатам АТН в отношении размера частиц и дисперсии. Флуорометрический анализ и вестерн-блот показали эффективный перенос мембрано-свя-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-24-00224.

занных и ядерных компонентов в ИВ при использовании УЗ, в то время как ЦхВ обеспечивает лучший перенос компонентов цитоплазмы. Также вестерн-блот показал, что ИВ, полученные обоими методами, способны нести функционально важные белки CD3, HLAII и гранзим В.

Заключение

Мы показали, что и ЦхВ, и УЗ позволяют получить искусственные везикулы. УЗ оказывается более эффективным в производстве большего количества ИВ при измерении количества частиц и общего содержания белка. В то же время по качеству получаемых ИВ эти два метода индукции показывают разные результаты. ИВ, индуцированные УЗ, показали более высокое содержание мембрано-связанных белков и ядерных компонентов родительских клеток и более низкое содержание цитозольных и цитоплазматических белков. Еще одним интересным наблюдением является нарушение целостности мембраны во время обработки ультразвуком, что потенциально может быть использовано для усиления ИВ с терапевтической или иной функциональной полезной нагрузкой, например низкомолекулярными препаратами, генетическими векторами, белками, флуоресцентными соединениями и т. д.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-83

**МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ $ZnFe_2O_4@MnFe_2O_4$ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НОСИТЕЛЬ
ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЛИПАЗЫ** **$ZnFe_2O_4@MnFe_2O_4$ MAGNETIC NANOPARTICLES AS A PROMISING CARRIER
FOR LIPASE IMMOBILIZATION**

Я. А. Ионов, И. Д. Шабалкин, Е. А. Назарова

Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

Y.A. Ionov, I.D. Shabalkin, E.A. Nazarova

SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

✉ ta.t201460@gmail.com

Аннотация

В сфере разработки высокоэффективных биокатализаторов требуются все более современные методы их получения, к примеру, подбор новых носителей для ферментов. Носитель может обеспечивать устойчивость к различным видам воздействия на биомолекулу или изменять условия проведения реакции. В работе рассматривается способ иммобилизации ферментов на модифицированных магнитных наночастицах, способных разогревать среду при воздействии электромагнитного излучения.

Abstract

In the field of development of highly efficient biocatalysts, more modern methods of their production are required, for example, the selection of new carriers for enzymes. The carrier can provide resistance to various effects on the biomolecule or change the conditions of the reaction. The thesis considers a method of enzyme immobilization on modified magnetic nanoparticles capable of heating the medium under the influence of electromagnetic radiation.

На сегодняшний день магнитные наночастицы находят свое применение во многих сферах исследований. Их основными преимуществами являются простота получения, варьирование размеров и возможность контролирования частиц с помощью магнитных полей. Кроме того, с появлением новых модификаций магнитных частиц открываются все более широкие перспективы их использования, в том числе как носителей для ферментов. Так, управляемо-нагревающиеся магнитные наночастицы, феррито-цинковые частицы с феррито-марганцевым покрытием, способные разогревать среду при воздействии переменного магнитного поля [1], представляют интерес для иммобилизации ферментов с повышенным температурным оптимумом. Липолитические ферменты являются показательной моделью для иммобилизации на данных наночастицах, так как они чувствительны к температурному режиму проведения катализа в области 40–60 °С, характерной и для композиционного материала. В работе предлагается рассмотреть процесс создания нового биокатализатора путем иммобилизации липазы на магнитных наночастицах $ZnFe_2O_4@MnFe_2O_4$.

При проведении исследований использовали липазу гриба, полученную на кафедре технологии микробиологического синтеза СПбГТИ (ТУ). В предварительных испытаниях фермент иммобилизовали на магнитных частицах магнетита с помощью связывания глутаровым альдегидом [2]. Многократность применения полученного препарата изучали по количеству циклов гидролиза пара-нитрофенилпальмитата в фосфатном буфере при постоянной температуре. В результате биокатализатор показал свою эффективность и высокую устойчивость.

В дальнейшем предполагается, что данный способ иммобилизации будет эффективен и для магнитных наночастиц $ZnFe_2O_4@MnFe_2O_4$. Изменение частоты поля влияет на нагрев частиц, что позволит проводить процесс в температурном оптимуме липазы, равном 50 °С, для увеличения скорости реакции. Таким образом, новый носитель со всеми преимуществами магнитных наночастиц позволит ускорить биокаталитическое получение продуктов.

Литература

1. Shabalkin I.D. et al. Multifunctional tunable $ZnFe_2O_4@MnFe_2O_4$ nanoparticles for dual-mode MRI and combined magnetic hyperthermia with radiotherapy treatment // *Journal of Materials Chemistry B*. 2023. Vol. 11, № 5. P. 1068–1078.
2. Darwesh O.M. et al. Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications // *Methods in Enzymology*. 2020. Vol. 630. P. 481–502.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-84

**ВЛИЯНИЕ МАТРИЦЫ ПЭДОТ:ПСС-БСА НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
МИКРОБНЫХ КЛЕТОК И ИХ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ****EFFECT OF PEDOT:PSS-BSA MATRIX ON THE RESPIRATORY ACTIVITY
OF MICROBIAL CELLS AND THEIR MEMBRANE FRACTIONS**К. В. Кадисон¹, А. Г. Быков², В. А. Арляпов¹, А. Н. Решетилов²¹Тулский государственный университет²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, ПуцдиноK. V. Kadison¹, A. G. Bykov², V. A. Arlyapov¹, A. N. Reshetilov²¹Tula State University²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino

✉ kosya.kadison.032@mail.ru

Аннотация

Было изучено изменение дыхательной активности клеток *G. oxydans* VKM В-1280 и их мембранных фракций по отношению к глюкозе и этанолу под действием ПЭДОТ:ПСС (поли(3,4-этилендиокситиофен):(полистеренсульфоновая кислота)) и БСА (бычий сывороточный альбумин).

Abstract

We studied the changes of respiratory activity of *G. oxydans* VKM В-1280 cells and their membrane fractions toward glucose and ethanol under the action of PEDOT:PSS (poly(3,4-ethylenedioxythiophene):(polystyrenesulfonic acid)) and BSA (bovine serum albumin).

В настоящее время проводящий полимер ПЭДОТ:ПСС активно изучается и является перспективным материалом для использования в электрохимических биосенсорах. Он обладает высокой электрической проводимостью, химической стабильностью и биосовместимостью [1]. Известно, что ПЭДОТ проявляет антибактериальную активность [2], поэтому может оказывать ингибирующее действие на клетки в составе микробных электрохимических биосенсоров. Для нивелирования этого эффекта можно использовать дополнительные реагенты, обладающие высокой биосовместимостью [3].

Изучение влияния композиции ПЭДОТ:ПСС-БСА и отдельных ее компонентов для иммобилизации бактериальных клеток и их мембранных фракций (МФ) не проводилось. Ранее было изучено влияние параметров отдельных компонентов данного композита на функционирование фермента глюкозооксидазы в амперометрических биосенсорах [4, 5].

Цель работы — исследование влияния отдельных компонентов проводящей матрицы ПЭДОТ:ПСС-БСА на дыхательную активность клеток штамма *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* VKM В-1280 и их мембранных фракций (МФ) для оценки возможности их дальнейшего применения в составе электрохимических биосенсоров.

Результаты

Основой рецепторного элемента биосенсора являлись иммобилизованные сорбцией на хроматографической бумаге клетки *G. oxydans* VKM В-1280 и их МФ. Для изучения влияния проводящей матрицы хроматографическую бумагу пропитывали отдельными компонентами и смесью ПЭДОТ:ПСС-БСА. Концентрация бактериальных клеток и МФ во всех экспериментах была постоянной и составляла 1 мг сырой биомассы. Полученные данные представлены в таблице.

При переходе от клеток к МФ как основе биорецептора наблюдали рост сигналов при введении субстратов. Это связано с увеличением доли целевых ферментов в МФ после дезинтеграции. При модификации рецепторного элемента компонентами проводящей смеси наблюдали снижение дыхательной активности как клеток, так и МФ, вне зависимости от введенного субстрата. Следует отметить, что наибольшее снижение дыхательной активности по отношению к субстратам регистрировали для МФ, что связано с разрушением защитных структур ферментов при получении МФ.

Величина сигналов биосенсоров на основе кислородного электрода типа Кларка при введении 0,5 мМ субстрата (соотношение полимера и биоматериала составляло 1 : 1)

Состав биорецептора	Бактериальные клетки		МФ клеток	
	Глюкоза	Этанол	Глюкоза	Этанол
Биоматериал, абсолютные значения, нА/с	0,18 ± 0,05	0,72 ± 0,09	0,21 ± 0,03	0,92 ± 0,11
Биоматериал, относительные значения, %	100	100	100	100
БСА : биоматериал, %	83	80	66	44
ПЭДОТ:ПСС : биоматериал, %	44	80	42	29
ПЭДОТ:ПСС-БСА : биоматериал, %	83	76	71	30

Снижение дыхательной активности биокатализаторов при модификации биорецептора проводящей матрицей и ее отдельными компонентами в случае целых клеток не являлось значительным, что говорит о возможности использования этой матрицы в составе микробных электрохимических биосенсоров.

Литература

1. Решетиллов А. Н., Китова А. Е., Тарасов С. Е. и др. Высокопроводящий полимер ПЭДОТ:ПСС — применение в биомедицинских и биоэлектрохимических системах. РЭНСИТ, 2020. Т. 12 (4). С. 471–482.
2. Gupta S., Datt R., Mishra A. et al. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene):Poly(styrene sulfonate) in antibacterial, tissue engineering and biosensors applications: Progress, challenges and perspectives // J. Appl. Polym. Sci. 2022. Vol. 139 (30). P. e52663.
3. Nifant'ev I., Besprozvannykh V., Shlyakhtin A. et al. Chain-End Functionalization of Poly(ϵ -caprolactone) for Chemical Binding with Gelatin: Binary Electrospun Scaffolds with Improved Physico-Mechanical Characteristics and Cell Adhesive Properties // Polymers. 2022. Vol. 14. P. 4203.
4. Nien P. C., Tung T. S., Ho K. C. Amperometric Glucose Biosensor Based on Entrapment of Glucose Oxidase in a Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Film // Electroanalysis. 2006. Vol. 18. P. 1408–1415.
5. Li Y. Y., Ma X. X., Song X. Y. et al. Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized on BSA Cross-Linked Nanocomposite Modified Glassy Carbon Electrode // Sensors. 2023. Vol. 23. P. 3209.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-85

**ПРИМЕНЕНИЕ ПОДХОДА «ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА»
ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ СЕБЕСТОИМОСТИ АФС**

APPLICATION OF THE DESIGN OF EXPERIMENT APPROACH TO REDUCE THE COST OF API

А. В. Казакова, С. А. Ищук

ООО «Герофарм», Санкт-Петербург

A. V. Kazakova, S. A. Ishchuk

Geropharm, LLC, Saint Petersburg

✉ Angelina.Kazakova@geropharm.com

Аннотация

Данная работа посвящена снижению себестоимости АФС путем оптимизации технологии с использованием подхода «дизайн эксперимента». Проведены дробнофакторные и полнофакторные эксперименты для четырех стадий процесса, построены проектные поля. В результате выход целевого продукта увеличен на 30 %, длительность процесса сокращена на 19 ч, себестоимость продукта уменьшена на 44 %.

Abstract

This work is devoted to reducing the cost of API by optimizing the technology using the design of experiment approach. Fractional- and full-factorial experiments were carried out for four stages of the process, design fields were built. As a result, the yield of the target product is increased by 30 %, the duration of the process is reduced by 19 h, the cost of the product is reduced by 44 %.

Уменьшение себестоимости АФС — актуальная задача современной фармацевтической промышленности. В условиях постоянного роста цен на сырье и материалы снижение расходов на производство высвобождает ресурсы компании для инвестиций в разработку новых инновационных препаратов, обладающих большей эффективностью и обеспечивающих лучший терапевтический эффект по сравнению с препаратами прошлого поколения.

Снижение стоимости производства может быть достигнуто различными способами. Например, за счет снижения стоимости расходных материалов при смене поставщика, рационального энергопотребления или за счет сокращения отходов производства при внедрении технологий вторичной переработки. При этом внесенные в технологический процесс изменения должны обеспечивать поддержание качества готового продукта, его безопасность и соответствие нормативным стандартам.

Одним из наиболее наукоемких способов снижения себестоимости является оптимизация технологии. Анализ производственного процесса на предмет неэффективности (низкие выходы на стадиях) и наличия узких мест (длительность процесса) определяет направления оптимизации, ведущие к снижению прямых и косвенных расходов на производство.

В данной работе для оптимизации технологии использовали дизайн экспериментов (DOE) — мощный статистический инструмент, позволяющий выявлять факторы, влияющие на выход продукта и на его качество, а также на основании установленных статистических закономерностей предсказывать значения факторов, ведущие к получению определенного результата.

Целью данной работы являлось снижение себестоимости субстанции экстракционного препарата. Технология включала в себя четыре последовательные стадии: экстракция, осаждение, фильтрация и сушка, измельчение. Для каждой из четырех стадий были выбраны факторы, которые могут оказывать влияние на качество и количество получаемого препарата (6, 3, 5 и 3 соответственно). В перечень факторов, оказывающих влияние на выход продукта, обязательно входила длительность проведения стадии или ее отдельных этапов.

Далее были определены диапазоны (уровни) факторов и выбраны планы экспериментов. Для стадий экстракции и фильтрации были выбраны дробнофакторные планы, включающие в себя 19 экспериментов, для стадий осаждения и измельчения — полнофакторные, включающие 11 экспериментов. В качестве откликов использовали показатели количественного определения, определяемые методами спектрофотометрии и RP-HPLC, и молекулярно-массового распределения, определяемые методами капиллярного электрофореза и SE-HPLC.

В результате экспериментов были получены модели хорошего качества, позволившие описать технологию. Были определены условия, позволяющие увеличить выход продукта на 30 % в рамках действующих технологических инструкций за счет изменения температурного режима осаждения. Общая длительность процесса также была снижена на 18 ч за счет изменения длительности стадий экстракции и сушки. Предсказанные оптимальные условия были проверены экспериментально — проведением экспериментов в большем масштабе. Полученные значения выходов продукта подтвердили надежность построенных моделей.

Экономические расчеты показали, что с учетом всех внесенных в технологический процесс изменений себестоимость продукта снизилась на 44 %.

Таким образом, в ходе данной работы было достигнуто снижение себестоимости активной фармацевтической субстанции за счет оптимизации технологии с применением статистического подхода DOE. Ценность полученных результатов также состоит в том, что разработанный подход к оптимизации может быть применен к другим продуктам компании.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-86

РАЗМНОЖЕНИЕ ЛАПЧАТКИ КУСТАРНИКОВОЙ МЕТОДОМ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ PROPAGATION OF SHRUBBY CINQUEFOIL BY CELL AND TISSUE CULTURE METHOD

А. Ю. Казиева

Сургутский государственный университет

A. Yu. Kazieva

Surgut State University

✉ amina.kazieva.2015@mail.ru

Аннотация

В работе изучено влияние безгормональной питательной среды Мурасиге — Скоога с половинным набором минеральных солей на процессы побего- и корнеобразования растений-регенерантов лапчатки кустарниковой в культуре *in vitro*.

Abstract

The effect of hormone-free nutrient medium Murashige — Skooga with a half set of mineral salts on the processes of shoot and root formation of regenerant plants of shrubby cinquefoil in *in vitro* culture was studied in this work.

Лапчатка кустарниковая (*Dasiphora fruticosa* L. Rybd.) — лекарственное растение, представляющее широкий интерес для науки благодаря высокому содержанию важных биологически активных веществ. На территории севера Западной Сибири *D. fruticosa* является редким видом и занесена в Красную книгу Ханты-Мансийского автономного округа — Югры (2013), поэтому все большую актуальность приобретают вопросы ускоренного размножения данного лекарственного растения методами культуры клеток и тканей [1].

Объектом исследования послужили различные сортотипы лапчатки кустарниковой из коллекции ботанического сада СурГУ. Растения *D. fruticosa* выращивали на питательной среде ½ MS в течение 60 дней. В качестве контроля использовали растения аборигенной формы, выращенные на питательной среде MS с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5 мл/л. Культивирование растений происходило при оптимальных условиях: температуре воздуха +20...+23 °С, освещении белыми диодами со световым потоком 4000 лм, при 16-часовом световом режиме. В процессе роста растений отмечали количество побегов, листьев и корней, длину побегов и корней и площадь рабочей адсорбирующей поверхности корней.

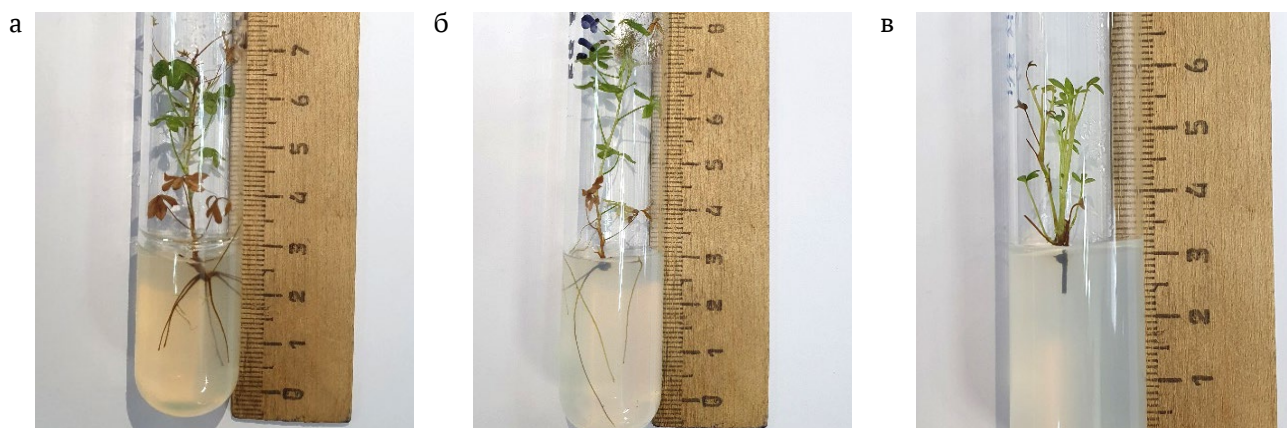
Культивирование на питательной среде MS с уменьшенной вдвое концентрацией макро- и микросолей, хелата железа и хлорида кальция позволяет в короткие сроки (60 дней) получить большое количество (80 %) жизнеспособных и здоровых эксплантов, тогда как в контроле этот показатель значительно ниже и составляет 50 % (см. таблицу).

Биометрические показатели эксплантов лапчатки кустарниковой на этапе «собственно микроразмножение»

Сортотип	Количество побегов, шт.	Длина побега, см	Количество листьев, шт.	Количество корней, шт.	Длина корня, см
Бежевый	3 ± 0,3	3,77 ± 0,3	16 ± 2,6	5 ± 1,3	3,09 ± 0,3
Белый	3 ± 0,4	4,21 ± 0,2	18 ± 1,8	6 ± 0,9	4,25 ± 0,2
Аборигенный	2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	15 ± 1,3	—	—

Биометрические показатели у курильского чая белого сортотипа достоверно не отличаются от бежевого, что говорит о сортовых особенностях растений.

Через 30 дней культивирования у 50 % эксплантов наблюдался активный ризогенез (см. рисунок), несмотря на отсутствие в питательной среде фитогормонов. В контроле за текущий период корни не образуются.



Экспланты лапчатки кустарниковой на втором этапе микроразмножения:
а — белый, *б* — бежевый, *в* — аборигенный (контроль)

Коэффициент размножения на безгормональной среде в среднем составляет 4-5, в контроле — 3.

При анатомо-морфологическом исследовании растений-регенерантов строение вегетативных органов было таким же (структура стебля и листьев), как у интактных растений. При исследовании корней растений-регенерантов лапчатки кустарниковой отмечено, что несмотря на отсутствие гормонов в питательной среде, корневая система хорошо развита: отмечено присутствие главного, боковых и придаточных корней с корневыми волосками. Анализ рабочей адсорбирующей поверхности растений-регенерантов показал, что больше половины (52 %) корней являются активными, обладающими высокой всасывающей способностью.

Рабочая поверхность корневой системы является важным показателем развития проводящих тканей у растений-регенерантов. От площади рабочей адсорбирующей поверхности корней зависит процент приживаемости растений при адаптации к нестерильным условиям *ex vitro*.

Таким образом, культивирование растений лапчатки кустарниковой на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS позволяет в кратчайшие сроки получать большое количество здоровых эксплантов с развитыми тканями и корневой системой.

Литература

1. Казиева А. Ю., Макарова Т. А. Особенности микроклонального размножения лапчатки кустарниковой // Наука и инновации XXI века: материалы VIII Всерос. науч.-практ. конф. Сургут: ИЦ СурГУ, 2022. С. 45–49.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-87

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО КЛЕЩЕВОГО ЗАЩИТНОГО АНТИГЕНА СЕРПИНА IPIS-1, ДОМЕНА RCL-ПЕТЛИ, КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS**

PRODUCTION OF A FRAGMENT OF RECOMBINANT TICK PROTECTIVE ANTIGEN SERPIN IPIS-1, RCL-LOOP DOMAIN, OF *IXODES PERSULCATUS* TICKS

К. В. Карелина, Р. Б. Баяндин, В. А. Терновой

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

K. V. Karelina, R. B. Bayandin, V. A. Ternovoi

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ karelina_kv@vector.nsc.ru

Аннотация

Инфекции, переносимые клещами, наносят значительный ущерб животноводству, они приводят к падению продуктивности, ослаблению иммунитета, появлению аллергических реакций, снижению веса, а в тяжелых случаях — к смерти. При укусе у клещей вырабатывается ряд белков — клещевых защитных антигенов, которые облегчают питание клеща на хозяине и тем самым способствуют передаче переносимых ими инфекций. Среди клещевых защитных антигенов можно выделить серпины — перспективный вариант для иммунизации животных. В исследованиях показано, что серпины слюны клещей взаимодействуют с белками хозяина, снижая при этом его иммунный ответ. В рамках данной работы был получен фрагмент рекомбинантного клещевого защитного антигена серпина Ipis-1, домена RCL-петли, клещей *Ixodes Persulcatus*.

Abstract

Infections carried by ticks cause significant damage to livestock production, infections lead to loss of productivity, weakened immunity, allergic reactions, weight loss, and in severe cases death. When bitten, ticks produce a number of proteins — tick defense antigens — that facilitate the tick's feeding on the host and thus facilitate the transmission of the infections they carry. Some of the tick protective antigens are serpins, a promising target for animal immunization and infection control. In studies, serpins from tick saliva have been shown to interact with host proteins while reducing the host immune response. In this study, we obtained a fragment of recombinant tick protective antigen serpin Ipis-1, an RCL-loop domain, from *Ixodes Persulcatus* ticks.

Состав слюны клещей широко изучается в контексте взаимодействия клеща и хозяина, поскольку вещества слюны активно участвуют в модуляции гомеостаза хозяина и передаче инфекции. Исследования состава слюны клещей на молекулярном уровне показали, что серпины играют важную роль во взаимодействии клеща и хозяина. Серпины представляют собой группу белков-ингибиторов сериновых протеаз и экспрессируются в слюнных железах клещей во время питания.

Клещевые серпины играют огромную роль в ингибировании гемостатических процессов и во врожденных и адаптивных иммунных реакциях хозяина. Их также изучают в качестве кандидатов для терапевтического использования и разработки вакцины. Успешная вакцинация против клещей была ранее достигнута путем воздействия на антиген кишечника клеща Vm86. За последние годы знания о составе слюны клещей значительно расширились из-за применения новейших высокопроизводительных методов транскриптомного, протеомного и функционального анализа. Были идентифицированы сотни белков слюны, которые способны нарушать защиту хозяина, снижая иммунный ответ [1].

Клещевые вакцины на сегодняшний день ориентированы на важные биологические процессы (преимущественно прикрепление и пищеварение клещей) с использованием комбинаций антигенов. Использование комбинации различных серпинов или других защитных антигенов повышает эффективность вакцинации. Данные, полученные с использованием двух и более клещевых защитных антигенов, демонстрируют высокую эффективность данного подхода, и дальнейшие исследования представляются перспективным направлением в борьбе с клещами и передаваемыми клещевыми инфекциями.

Серпины состоят из 350–500 аминокислотных остатков (а. о.), молекулярная масса варьируется от 40 до 60 кДа. Гибкая реакционноспособная центральная петля RCL с доменной структурой из 120 аминокислотных

* Исследования проводились на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
© К. В. Карелина, Р. Б. Баяндин, В. А. Терновой, 2023

остатков придает серпинам характерную структуру. Домен RCL-петли является ключевым звеном взаимодействия серпина с белками хозяина.

Серпин Iripis-1 является перспективным кандидатом для создания белковой вакцины, так как в исследованиях показано, что при взаимодействии клеща и хозяина он выступает в роли иммуносупрессора и подавляет гамма интерферон (IFN γ) у крупного рогатого скота [2].

Объектами исследования являлись клещи из Новосибирской обл. и белок слюнных желез клеща — серпин. Собранные клещи были гомогенизированы и генотипированы с помощью двух пар праймеров по митохондриальной 16S рРНК. Секвенирование производилось по методу Сэнгера на капиллярных секвенаторах ABI 3500/3500xl (Applied Biosystems, США). Клещи принадлежат к роду *Ixodes*, виду *persulcatus*.

Для получения последовательности в базе GenBank была взята последовательность для подбора праймеров: *Ixodes persulcatus* Iripis-1 mRNA for persulcatus immunosuppressant-1 (AB971750.1). Длина фрагмента — 1443 нуклеотида. Длина белковой последовательности BAP59746.1 — 377 аминокислот. С помощью программы UGENE были подобраны олигонуклеотидные праймеры для получения RCL-петли: F CACCGGCGGCATGTATGTG (расчетная температура отжига 55,4°); R GAGCTCACGGATGGATCCCA (расчетная температура отжига 55,9°). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием ПЦР-смеси 5X Screen mix (Евроген, Россия).

В плазмиду pET-200 D/TOPO (Thermo Fisher Scientific, США) был клонирован фрагмент нуклеотидной последовательности длиной 360 нуклеотидов. Полученный фрагмент был секвенирован и имел 100%-ю гомологию с участком RCL петли последовательности серпина Iripis-1 (рис. 1).

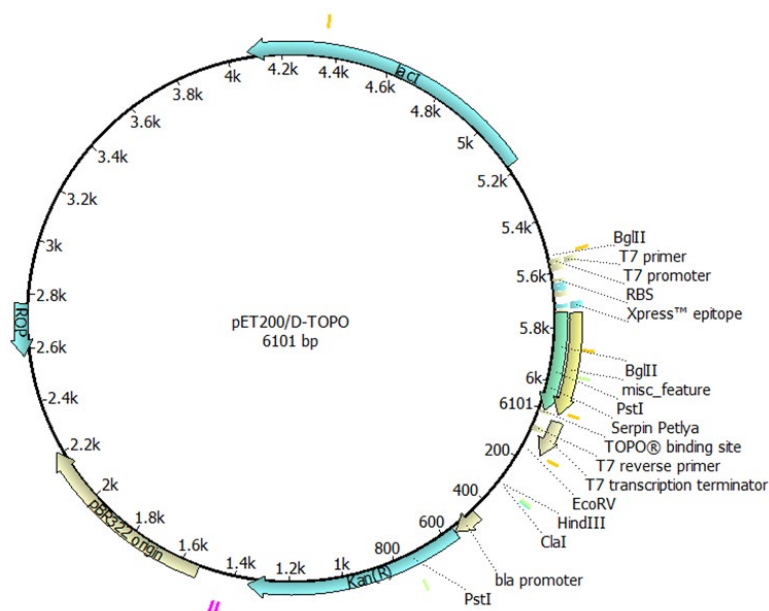


Рис. 1. Карта плазмиды pET-200 со вставкой RCL-петли

Для экспрессии белка компетентные клетки BL21(DE3) (Thermo Fisher Scientific, США) трансформировали плазмидой со вставкой RCL. Клетки нарабатывали в 200 мл среды LB с добавлением канамицина. По достижении необходимой оптической плотности 0,6–0,8 о. е. были взяты пробы до индукции, после чего был добавлен индуктор экспрессии ИПТГ (изопропил-D-тио-галактопиранозид, Медиген, Россия) 150 мкл 1 мМ. Экспрессия проводилась в двух колбах при 37° и при комнатной температуре (25 °C). Утром следующего дня был проведен белковый форез по Лэмли в 12%-м полиакриламидном геле. По результатам фореза было выявлено, что наш белок хорошо нарабатывается и при 37°, и при комнатной температуре, а также он начинает экспрессироваться сразу после добавления индуктора. Концентрация белка последовательно увеличивалась с течением времени, максимальное количество белка нарабатывалось спустя 20 ч. Далее белок был очищен с использованием Ni-NTA-Superflow (Qiagen, Германия) никельхелатной хроматографией. Молекулярная масса полученного белка совпадала с расчетной массой белка и составила 17 Кда.

После очистки были получены две фракции фрагмента рекомбинантного клещевого защитного антигена серпина Iripis-1 — домена RCL-петли. Концентрация белка в 1-й фракции составила 2,3 мг/мл; во 2-й фракции — 1,84 мг/мл.

С помощью сервиса SWISS-MODEL [3] была сконструирована пространственная структура белка Iripis-1 (рис. 2).

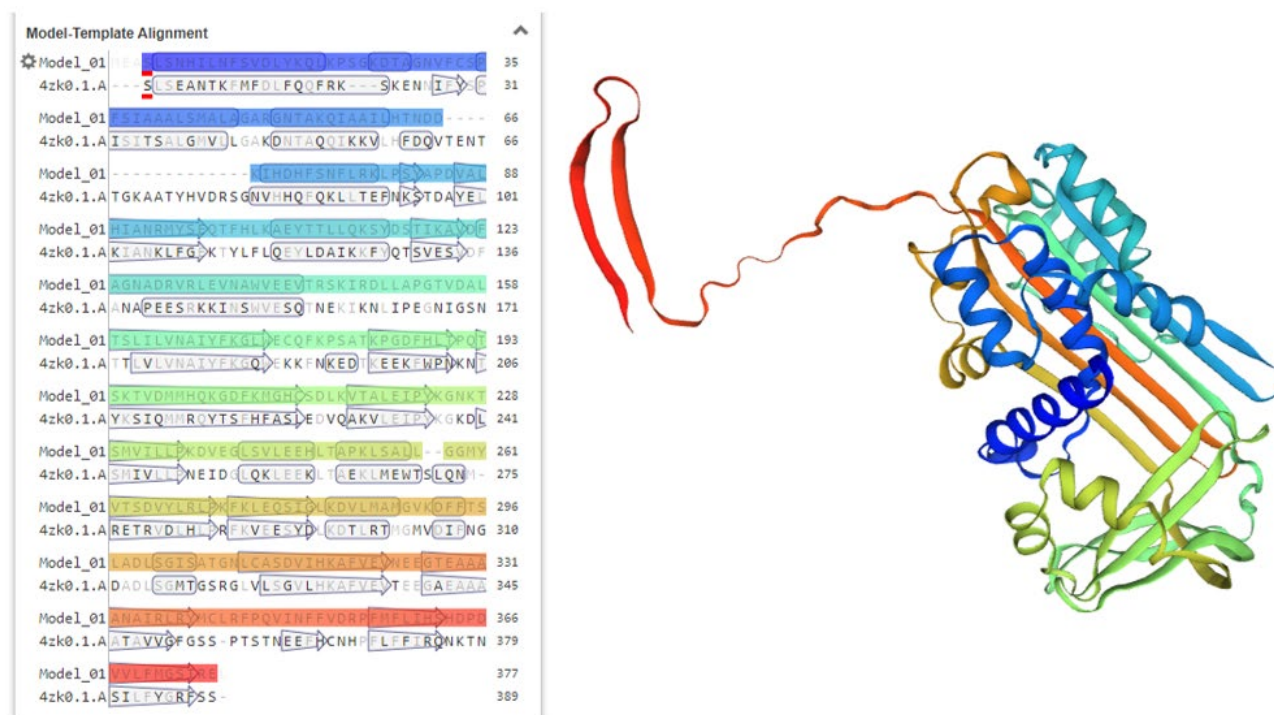


Рис. 2. Пространственная структура белка Iris-1 и выделенная красным RCL-петля

Таким образом, в данном исследовании был получен фрагмент рекомбинантного клещевого защитного антигена серпина Iris-1 — домен RCL-петли клеща *Ixodes persulcatus*. С помощью сервиса SWISS-MODEL для прототипной последовательности VAP59746.1 построена 3D-модель белка. В этой 3D-модели имеется характерная для многих представителей семейства серпинов петля RCL. Петля RCL по данным исследований взаимодействует с белками хозяина, а также участвует в иммуносупрессии хозяина при укусе клеща.

В дальнейшем планируется получение полноразмерного белка Iris-1, получение антител для проверки взаимодействия полученного белка и вырабатываемых антител, проверка взаимодействия антител с клещами.

Литература

1. De Rose R. et al. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 71. P. 151–160.
2. Toyomane K. et al. Identification and the preliminary in vitro characterization of IRIS homologue from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze // *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016. Vol. 7. P. 119–125.
3. SWISS-MODEL. URL: <https://swissmodel.expasy.org/>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-88

СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК НА ВОДНОЙ ФАЗЕ ПРОЦЕССА ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО ОЖИЖЕНИЯ БИОМАССЫ АКТИВНОГО ИЛА ***ABILITY OF BACTERIA TO FORM BIOFILMS ON THE AQUEOUS PHASE AFTER HYDROTHERMAL LIQUEFACTION OF ACTIVATED SLUDGE**С. В. Клементьев¹, Ю. В. Куликова², А. С. Сироткин¹¹Казанский национальный исследовательский технологический университет²Балтийский федеральный университет им. И. Канта, КалининградS. V. Klementev¹, Yu. V. Kulikova², A. S. Sirotkin¹¹Kazan National Research Technological University²Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

✉ slava_klementev3715@mail.ru

Аннотация

Исследована способность бактериальных изолятов (S2, S7, S9 и S11) формировать биопленку в течение 72 ч культивирования на водной фазе, полученной в результате гидротермального ожигения активного ила. Экспериментальные результаты показали, что изоляты S7 и S11 образовывали более плотную биопленку по сравнению с другими изолятами, в среднем на 43 %. Отмечено, что при совместном культивировании культур изолятов S7 и S11 наблюдалось увеличение массивности биопленки на 96 % по сравнению с отдельными изолятами.

Abstract

The ability of bacterial isolates (S2, S7, S9 and S11) to form biofilms for 72 h on the aqueous phase obtained as a result of hydrothermal liquefaction of activated sludge was studied. Experimental results showed that isolates S7 and S11 formed a more massive biofilm compared to other isolates by an average of 43 %. It was noted that during the co-cultivation of isolates S7 and S11, an increase in the massiveness of the biofilm by 96 % was observed compared with separate isolates.

Введение

В настоящее время в Российской Федерации осадки сточных вод размещаются на иловых картах и различных полигонах захоронения, что приводит к отчуждению территорий и дополнительной нагрузке на окружающую среду. К наиболее перспективным способам утилизации избыточного ила можно отнести гидротермальные методы конверсии с получением углерод-нейтрального топлива. Однако существенным недостатком гидротермальной конверсии отходов является образование высокотоксичных сточных вод (водной фазы), требующих предварительной очистки перед сбросом в водоемы [1]. К наиболее эффективному способу обезвреживания водной фазы можно отнести применение иммобилизованной биомассы, так как в составе биопленок бактерии лучше адаптируются и выживают в условиях стресса по сравнению со взвешенной биомассой [2].

Цель работы — экспериментально оценить способность бактериальных изолятов формировать биопленки, используя в качестве субстрата компоненты водной фазы, полученной в результате гидротермального ожигения избыточного активного ила.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали микробные изоляты (S2, S7, S9 и S11), полученные из активного ила ПАО «Нижнекамскнефтехим»; водная фаза, полученная после гидротермального ожигения биомассы избыточного активного ила коммунально-бытовых очистных сооружений г. Калининград (условия процесса ожигения: T = 260 °C, P = 4,5 Мпа, t = 20 мин). Способность бактерий к формированию биопленок оценивали по стандартной методике с использованием красителя генцианфиолетового [3]. Биопленки культивировали в течение 72 ч в пробирках Эппендорф.

Результаты

Полученные экспериментальные результаты показали, что все исследуемые изоляты способны образовывать биопленку, используя в качестве субстрата компоненты водной фазы. Менее развитую биопленку форми-

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-14-00064.

© С. В. Клементьев, Ю. В. Куликова, А. С. Сироткин, 2023

ровали изоляты S2 и S9 (0,096 и 0,098 усл. ед соответственно), изоляты S7 и S11 оказались более устойчивыми к токсичным соединениям водной фазы и синтезировали более массивную биопленку, чем культуры S2 и S9, в среднем на 41 и 43 % соответственно. Вероятно, это связано с особенностями метаболизма изучаемых культур и быстрой адаптации к условиям стресса. При совместном культивировании изолятов S7 и S11 было отмечено увеличение способности к формированию биопленки на 96 % по сравнению с отдельными монокультурами. Полученные результаты показывают, что биопленки, состоящие из микроорганизмов разных таксономических групп, плотнее, чем биопленки, состоящие из микроорганизмов одного вида [4].

Заключение

В ходе экспериментальных исследований была изучена способность микробных изолятов к формированию биопленок на водной фазе, образованной в результате гидротермального охижения избыточного активного ила. Отмечено, что изоляты S7 и S11 образуют более развитую биопленку по сравнению с другими изучаемыми культурами. Было показано, что при совместном культивировании вышеописанных изолятов наблюдалось увеличение массивности биопленки по сравнению с отдельными изолятами. Дальнейшие эксперименты будут посвящены изучению обезвреживания водной фазы с помощью иммобилизованной биомассы на различных носителях.

Литература

1. Swetha A., ShriVigneshwar S., Gopinath K. P. et al. Review on hydrothermal liquefaction aqueous phase as a valuable resource for biofuels, bio-hydrogen and valuable bio-chemicals recovery // *Chemosphere*. 2021. Vol. 283. P. 131248.
2. Гильдебрант А. В. и др. Формирование биопленок природными штаммами микроорганизмов в присутствии нафталина и антрацена // *Биотехнология*. 2021. Т. 37, № 6. С. 101–110.
3. Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С. и др. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий в формировании агрегированных микробных форм // *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 65, № 1. С. 105–113.
4. Николаев Ю. А., Плакунов В. К. Биопленка — «Город микробов» или аналог многоклеточного организма? // *Микробиология*. 2007. Т. 76, № 2. С. 149–163.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-89

ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-АПТАМЕРА К КАРДИОМАРКЕРУ КОПЕПТИНУ*
SELECTION OF DNA APTAMER AGAINST CARDIAC BIOMARKER COPEPTIN

Н. В. Комарова, О. С. Панова, А. А. Титов

Научно-производственный комплекс «Технологический центр», Москва

N. V. Komarova, O. S. Panova, A. A. Titov

Scientific-Manufacturing Complex “Technological Centre”, Moscow

✉ panovaolya691@yandex.ru

Аннотация

В работе описывается отбор ДНК-аптамера к кардиомаркеру копептину с использованием систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX). Олигонуклеотид Cpp-12p показал наибольшее сродство и специфичность к мишени. Для него было определено значение эффективной константы диссоциации, которое составило 210 ± 60 нМ.

Abstract

This paper describes the selection of a DNA aptamer for the copeptin cardiome marker using systematic ligand evolution by exponential enrichment (SELEX). Oligonucleotide Cpp-12p showed the highest affinity and specificity for the target. The value of effective dissociation constant was determined to be $(210 \pm 60$ nM).

Копептин, гликопептид из 39 аминокислот, является С-концевой частью прогормона аргинина-вазопрессина или антидиуретического гормона и выделяется в нейрогипофизе в эквимольных количествах. Это позволяет использовать копептин в качестве диагностического и прогностического биомаркера сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе для быстрого исключения острого инфаркта миокарда и прогнозирования смертности при сердечной недостаточности и инсульте [1].

Аптамеры представляют собой одноцепочечные олигонуклеотиды нуклеиновых кислот, которые проявляют специфическое связывание с желаемой мишенью. Электрохимические сенсоры на основе аптамеров демонстрируют хорошие аналитические характеристики для обнаружения сердечных биомаркеров и превосходят иммуносенсоры в стабильности, экономичности, простоте и возможности повторного использования [2].

Сейчас копептин выявляют с помощью иммуноанализа, в то время как аптамеры к копептину и, соответственно, аптасенсоры для него отсутствуют. Целью данной работы было получение и исследование характеристик аптамера к копептину для его дальнейшего использования в разработке биосенсора.

Отбор одноцепочечного ДНК-аптамера к копептину был проведен методом систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX) [3]. Библиотеку одноцепочечной ДНК, содержащую случайный участок длиной 30 оснований, использовали для процесса селекции против копептина, иммобилизованного в лунках микропланшета. Образец олигонуклеотидов инкубировали с белком; раствор ДНК, которая не связалась с мишенью, удаляли. Олигонуклеотиды, связавшиеся с лигандом, элюировали и амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). После очистки в полиакриламидном геле полученный образец ДНК подвергали следующему циклу отбора, чтобы добиться наибольшего сродства с мишенью. С четвертого цикла была добавлена дополнительная стадия отрицательного отбора, включающая инкубацию пробы ДНК с бычьим сывороточным альбумином (БСА), иммобилизованным в лунках микропланшета. При проведении отбора аптамеров было выполнено 8 циклов. Количество элюированной на всех циклах отбора ДНК определяли флуоресцентным методом. Изменения количества элюируемой ДНК по мере протекания отбора позволяет судить об успешности процесса SELEX. Экспериментально наилучшее соотношение сигналов целевой и отрицательной селекции наблюдалось на шестом цикле SELEX (рис. 1), что свидетельствует о наибольшей степени обогащения этой ДНК-библиотеки аффинными к мишени лигандами.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-79-10175, <https://rscf.ru/project/21-79-10175/>.
© Н. В. Комарова, О. С. Панова, А. А. Титов, 2023

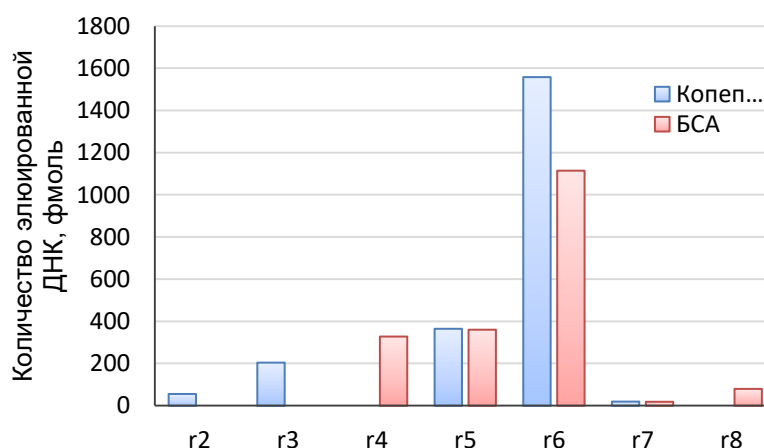


Рис. 1. Зависимость количества элюированной ДНК для копептина (положительный отбор) и БСА (противоотбор) от номера цикла отбора для SELEX с немодифицированной ДНК-библиотекой

Для образца ДНК-библиотеки, полученной на шестом цикле отбора, было выполнено высокопроизводительное секвенирование по технологии Illumina. Весь массив полученных последовательностей был кластеризован с помощью специализированного программного обеспечения FASTAptamer [4]. Из 17 кластеров, обладающих максимальной численностью, было отобрано по одной последовательности с максимальной встречаемостью (их алгоритм считал начальными для каждого из кластеров) в качестве потенциальных аптамеров к копептину. Отобранные последовательности были синтезированы химически для дальнейшего анализа связывания с копептином.

Для скрининга связывания полученных олигонуклеотидов с копептином использовали метод FLAA (fluorescent dye linked aptamer assay) [5]. Флуоресцентный сигнал в лунках с изучаемыми олигонуклеотидами сравнивали с сигналом несвязывающего контроля — исходной ДНК-библиотеки. 5 олигонуклеотидов были отобраны для дальнейшей характеристики. Олигонуклеотид Cpp-12p показал наибольшее сродство и специфичность к копептину. Для него также методом FLAA было определено значение эффективной константы диссоциации, которое составило (210 ± 60) нМ (рис. 2).

Таким образом, ДНК-олигонуклеотид Cpp-12p является аптамером к копептину и демонстрирует потенциал для разработки аптасенсоров для обнаружения этого белка.

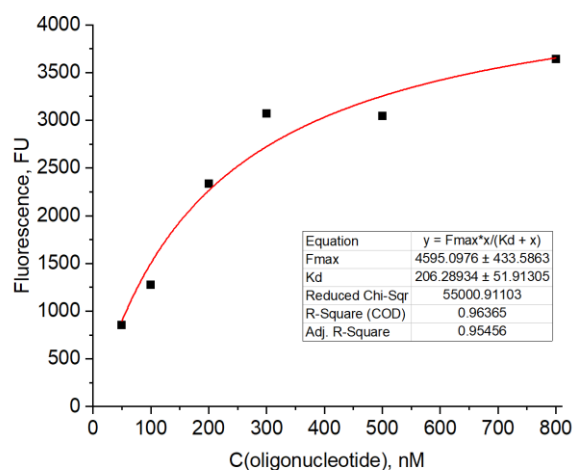


Рис. 2. Расчет значения эффективной константы диссоциации по отношению к копептину для олигонуклеотида Cpp-12p

Литература

1. Komarova N. et al. Aptamers targeting cardiac biomarkers as an analytical tool for the diagnostics of cardiovascular diseases: A review // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10, № 5. P. 1085.
2. Zhong S. et al. Recent advances in electrochemical aptasensors for detecting cardiac biomarkers: A review // *Microchemical Journal*. 2023. P. 109063.
3. Tuerk P., Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase // *Science*. 1990. Vol. 249, № 4968. P. 505-510.
4. Alam K.K., Chang J.L., Burke D.H. FASTAptamer: a bioinformatic toolkit for high-throughput sequence analysis of combinatorial selections // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2015. Vol. 4.
5. Sabrowski W. et al. The use of high-affinity polyhistidine binders as masking probes for the selection of an NDM-1 specific aptamer // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 7936.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-90

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СТРЕПТОКОККОВ*

LYTIC ENZYMES OF STREPTOCOCCI: POSSIBILITIES OF USING

С. В. Константинова¹, И. С. Бокша^{1,2}, В. Г. Лунин¹, Т. А. Данилова¹,
М. С. Попонова¹, А. М. Лящук¹, З. М. Галушкина¹, Е. В. Устенко¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи, Москва

²Научный центр психического здоровья, Москва

S. V. Konstantinova¹, I. S. Boksha^{1,2}, V. G. Lunin¹, T. A. Danilova¹,
M. S. Poponova¹, A. M. Lyashchuk¹, Z. M. Galushkina¹, E. V. Ustenko¹

¹Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

²Mental Health Research Centre, Moscow

✉ boksha_irina@mail.ru

Аннотация

Патогенные стрептококки синтезируют ферменты, расщепляющие IgG человека: *Streptococcus pyogenes* синтезирует IdeS, *S. zooepidemicus* — IdeZ. Получены рекомбинантные IdeS и IdeZ, свойства и активность которых идентичны таковым у описанных в литературе ферментов. Специфичность расщепления IgG рекомбинантными IdeS и IdeZ подтверждена масс-спектрометрией. Показана возможность применения рекомбинантных IdeS и IdeZ в медицине, ветеринарии и биотехнологии.

Abstract

Pathogenic streptococci synthesize enzymes that cleave human IgG: *Streptococcus pyogenes* synthesizes IdeS, and *S. zooepidemicus* — IdeZ. We have produced recombinant IdeS and IdeZ, the properties and activity of which are identical to those of the enzymes described in literature. The specificity of IgG cleavage with recombinant IdeS and IdeZ has been confirmed by mass spectrometry. The possibility of using recombinant IdeS and IdeZ in medicine, veterinary medicine and biotechnology has been shown.

Патогенные стрептококки синтезируют ферменты, расщепляющие IgG человека. Так, *Streptococcus pyogenes* секретирует EndoS и IdeS. EndoS гидролизует консервативный N-концевой гликан тяжелых цепей IgG. Эндопептидаза IdeS с высокой специфичностью расщепляет IgG всех подклассов в нижней части шарнирной области тяжелой цепи с образованием F(ab)₂-фрагмента, полностью сохраняющего антигенсвязывающую активность, и димерного Fc-фрагмента. *S. Zooepidemicus* продуцирует эндопептидазы IdeZ и IdeE, являющиеся гомологами IdeS *S. pyogenes*. Упомянутые ферменты имеют биотехнологический потенциал. Так, отщепление гликанов, так же как и укорочение тяжелых цепей IgG путем их высоко специфического расщепления, повышает эффективность масс-спектрометрического фингерпринтинга и расшифровки аминокислотных последовательностей IgG, что уже применяется в биотехнологии для определения аминокислотной последовательности антител [1].

Медицинское применение IdeS в области трансплантологии, а также для предотвращения и лечения тромбоза, развивающегося в рамках постковидного или поствакцинного синдромов, интенсивно разрабатывается за рубежом и основано на введении в кровь пациентам раствора активного фермента IdeS [2]. Вместе с тем медицинское применение IdeS отчасти ограничено из-за наличия в крови многих представителей, например европейской популяции, антител к IdeS, выработавшихся в организме из-за перенесенной инфекции *S. Pyogenes*. Этим обусловлена необходимость предварительного скрининга пациентов и определения в сыворотке крови титров антител к IdeS. В литературе уже описаны попытки удачного использования IdeZ вместо IdeS в таких целях. Однако не исключено наличие в крови пациентов также и антител к IdeZ: большинство людей контактирует с домашними животными, а некоторые употребляют в пищу необработанные термически молочные продукты, что повышает риск передачи инфекции от животных человеку.

В ближайшее время предстоит оценить, насколько распространены случаи инфекции, вызванной *S. Pyogenes* или *S. Zooepidemicus*, среди московских пациентов, обращающихся за помощью к врачам-инфекцио-

* Работа выполнена в рамках темы П8 государственного задания «Изучение молекулярных механизмов вирулентности условно-патогенных возбудителей инфекционных заболеваний для создания лечебно-профилактических биопрепаратов с использованием хромосомной инженерии прокариотических и эукариотических микроорганизмов».

© С. В. Константинова, И. С. Бокша, В. Г. Лунин, Т. А. Данилова, М. С. Попонова, А. М. Лящук, З. М. Галушкина, Е. В. Устенко, 2023

нистам. Действительно, IdeS и IdeZ, рассматриваемые в качестве антигенов, служат основой аналитических тест-систем стрептококковой инфекции, и эти системы востребованы не только в медицине, но и в санитарной микробиологии и ветеринарии. Действительно, о наличии, стадии протекания, остроте инфекционного заболевания и реакции на него организма судят по уровням (титрам) антител на данные антигены в крови человека и домашних животных. Среди животных описаны вспышки заболевания, вызываемого *S. Zooepidemicus* и носящего массовый характер с опасной возможностью межвидовой, включая человека, передачи патогенного возбудителя инфекции.

Мы получили рекомбинантные IdeS и IdeZ, по свойствам и активности близкие к ферментам, описанным в литературе, и разработали на основе IdeZ тест-систему иммуноферментного анализа (ИФА) для определения титров антител к ней в крови животных [2]. В ИФА концентрация белка IdeZ, сорбированного на иммунологический планшет, составляла 5 мкг/мл. Пример использования тест-системы для определения титров антител к IdeZ в сыворотках лошадей, перенесших острую инфекцию *S. Zooepidemicus* и не болевших в острой форме, которая была зарегистрирована ветеринарами и владельцами животных, показан на рисунке.

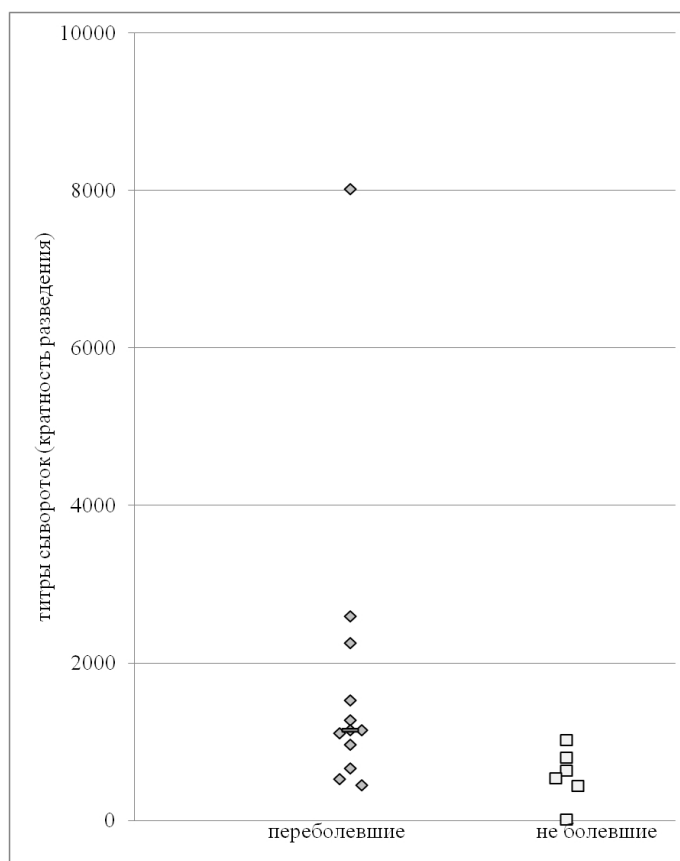
Как показал U-тест Манна — Уитни, различия титров между группой переболевших

и не болевших животных статистически значимы ($p < 0,05$). Наличие измеримых титров в крови не болевших животных объясняется их контактом с патогенным возбудителем инфекции.

Таким образом, разработанная нами тест-система позволяет выявить перенесенную инфекцию *S. Zooepidemicus*.

Литература

1. An Y., Zhang Y., Mueller H.-M. et al. A new tool for monoclonal antibody analysis // *Mabs*. 2014. Vol. 6. P. 879–893.
2. Jordan S. C., Lorant T., Choi J. et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation // *New England Journal of Medicine*. 2017. Vol. 377. P. 442–453.
3. Бокша И. С., Лунин В. Г., Данилова Т. А. и др. Рекомбинантные эндопептидазы IdeS и IdeZ и возможный потенциал их применения // *Биохимия*. 2023. Т. 88 (6). С. 900–912.



Титры (кратность разведения) сывороток переболевших и не болевших стрептококковой инфекцией животных

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-91

РАЗРАБОТКА РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ТРИТИОЦИАНУРОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

DEVELOPING REDOX-SENSITIVE NANOPARTICLES BASED ON TRITHIOCYANURIC ACID FOR THE TARGET DELIVERY OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Е. А. Кополева, А. Пельтек

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E. A. Kopoleva, A. Peltek

ITMO University, Saint Petersburg

✉ lenkopoleva@yandex.ru

Аннотация

Работа посвящена разработке метода синтеза наночастиц на основе тритиоциануровой кислоты (ТТЦК) в качестве носителей низкомолекулярных противоопухолевых препаратов. Представленная работа включает описание метода синтеза частиц на основе ТТЦК, их структурной и морфологической характеристики и сорбционных свойств, а также изучение полученных наночастиц в качестве систем для доставки противоопухолевых препаратов *in vitro* на клеточных линиях 4T1 и A549.

Abstract

This research work is devoted to the developing of a method for the synthesis of trithiocyanuric acid (TTCA)-based nanoparticles as carriers of low molecular weight antitumour drugs. The presented work describes the method of synthesis of TTCA-based particles, their structural and morphological characterization, their sorption properties, as well as the study of the obtained nanoparticles as systems for *in vitro* delivery of antitumour drugs on 4T1 and A549 cell lines.

Разработка редокс-чувствительных наночастиц является перспективным направлением в развитии систем доставки биологически активных молекул [1]. Особенность их применения заключается в особом механизме высвобождения терапевтических агентов — возможности внутриклеточной деградации материала частиц за счет естественных окислительно-восстановительных процессов [2]. Это является перспективной стратегией для достижения стимул-чувствительного и контролируемого высвобождения лекарственных средств благодаря значительному различию в концентрации глутатиона внутри опухолевых клеток и в межклеточной среде [3]. Одним из материалов для редокс-чувствительных частиц могут выступать соединения, содержащие дисульфидные связи, способные их восстанавливать под воздействием глутатиона [4, 5]. В настоящей работе были синтезированы полимерные наночастицы (НЧ) на основе тритиоциануровой кислоты (ТТЦК). Этот материал ранее не применялся для подобных исследований, однако наличие трех тиоловых групп делает его перспективным мономером для получения редокс-чувствительных систем.

Таким образом, цель исследования — разработать редокс-чувствительные системы доставки низкомолекулярных противоопухолевых препаратов на основе наночастиц из ТТЦК.

Была разработана методика получения наночастиц ТТЦК, модифицированных диглицидилловым эфиром полиэтиленгликоля (ПЭГДЭ) с размером 175 нм. Такие частицы стабильны в биологических средах, а также имеют высокое значение заряда поверхности (ζ -потенциал = $-29,3$ мВ). Также были изучены структурная и морфологическая характеристики синтезированных материалов методами ИК-спектроскопии, РФЭС, динамического рассеяния света и сканирующей электронной микроскопии. Затем было проведено исследование сорбирующих свойств НЧ с доксорубицином (ДОКС) в качестве модельного вещества. Максимальная адсорбция составила около 70 мг ДОКС на 1 г НЧ. Изучение десорбции проводили в четырех растворителях с разной природой: ПБС, АЦЦ, глутатион, этанол и вода. Наибольший процент релиза происходит в АЦЦ и глутатионе, способных восстановить дисульфидную связь в НЧ, тем самым разрушая их и высвобождая запакванное вещество.

Следующим шагом стало изучение взаимодействия ТТЦК-ПЭГ НЧ с клеточными линиями карциномы молочной железы мыши 4T1 и базальными эпителиальными клетками человека A549. Клеточная ассоциация была изучена методом проточной цитометрии. С увеличением концентрации НЧ увеличивается количество ассоциированных с НЧ клеток, таким образом, при концентрации выше 50 мкг/мл более 90 % клеток являются ассоциированными с НЧ. Также была изучена интернализация наночастиц в зависимости от времени с помощью

конфокальной микроскопии. Последним этапом стало исследование токсичности полученных ТТЦК-ПЭГ НЧ с помощью дифференциальной окраски живых и мертвых клеток (Calcein AM). Полученные результаты говорят об отсутствии влияния просто НЧ на жизнеспособность клеток, в то время как НЧ с ДОКС снизили жизнеспособность опухолевых клеток до < 20 % по сравнению с контролем.

Из полученных результатов следует, что тритиоциануровая кислота — это перспективное соединение для дальнейшей разработки редокс-чувствительных систем доставки малых терапевтических молекул. Данная работа показала, что полученный материал на основе поликонденсированной ТТЦК является нетоксичным, биосовместимым полимером с хорошей адсорбционной емкостью. В дальнейшем предполагается продолжение изучения системы доставки на основе полученных наночастиц уже на лабораторных животных в рамках доклинических испытаний.

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., Tarakanchikova 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, № 47. P. 12131–12142.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-92

**РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ
МЕТОДОМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ**

**DEVELOPMENT OF A KIT OF REAGENTS FOR THE DETECTION OF YELLOW FEVER VIRUS RNA
BY ISOTHERMAL AMPLIFICATION WITH REVERSE TRANSCRIPTION**

Е. И. Кривошеина, М. Ю. Карташов, Е. В. Чуб

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

E. I. Krivosheina, M. Yu. Kartashov, E. V. Chub

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ katr962@mail.ru

Аннотация

В данной работе разработан экспериментальный набор реагентов для выявления РНК вируса желтой лихорадки (ВЖЛ) методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипции. Получена плазмидная конструкция, содержащая фрагмент NS1 гена ВЖЛ, служащая положительным контролем в реакции. Определены аналитическая чувствительность и специфичность анализа при использовании разработанного набора реагентов.

Abstract

In this study we developed an experimental kit of reagents for the detection of yellow fever virus (YFV) RNA by loop isothermal amplification from reverse transcription. A plasmid construct containing the NS1 fragment of the YFV gene, which serves as a positive control in the reaction, was obtained. The analytical sensitivity and specificity of the analysis were determined using the developed set of reagents.

Введение

Диагностировать желтую лихорадку клинически достаточно проблематично, так как ее проявления напоминают симптомы широкого спектра инфекционных заболеваний: малярии, лихорадки денге, лептоспироза и др. В большинстве случаев решающее значение для постановки правильного диагноза имеют результаты лабораторных исследований. Метод петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией представляет собой быстрый, чувствительный, специфичный и недорогой подход для выявления РНК вирусов, в том числе и вируса желтой лихорадки (ВЖЛ). В связи с возрастающим туристическим потоком в страны, эндемичные по желтой лихорадке, а также обнаружением на территории южных регионов России устойчивых популяций комаров видов *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, являющихся основными переносчиками ВЖЛ, встает вопрос о разработке быстрых и эффективных тестов для подтверждения завозных случаев и изучения возможного распространения данного вируса комарами-переносчиками.

Цель исследования состояла в разработке набора реагентов для выявления РНК вируса желтой лихорадки методом изотермической амплификации с обратной транскрипции.

Материалы и методы

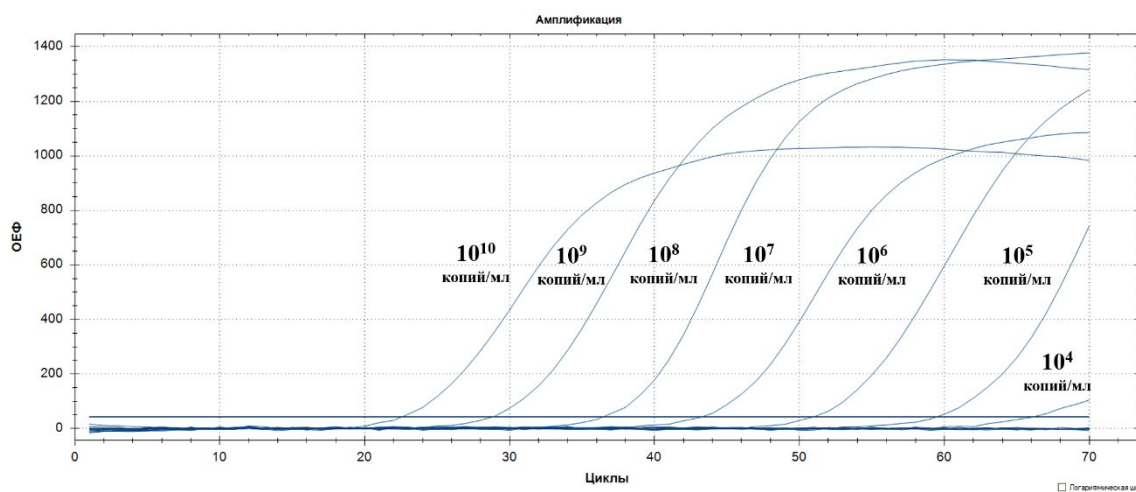
Положительный контрольный образец получали путем клонирования фрагмента гена NS1 ВЖЛ в плазмидную ДНК pCR2.1 и трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма TOP10. Очистку рекомбинантной плазмидной ДНК осуществляли набором Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Дизайн праймеров проводили при помощи программы PrimerExplorer V5, используя известные нуклеотидные последовательности геномов ВЖЛ, доступные в базе данных GenBank [1]. Для изотермической амплификации использовали реакционную смесь БиоМастер LAMP(2x), обратную транскриптазу RNAscribe RT (Биолабмикс, Россия) и флуоресцентный краситель EvaGreen (Biotium, США). Изотермическую амплификацию и детекцию результатов в режиме реального времени проводили на приборе CFX 96 (BioRad, США). Перед началом амплификации пробы прогревались при 63 °С в течение 5 мин. Затем проводились 70 циклов при температуре 63 °С в течение 25 с, детекцию проводили на каждом цикле на канале FAM.

Для определения аналитической чувствительности использовали 10-кратные разведения рекомбинантной плазмиды с известной концентрацией. Контроль специфичности определяли на панели образцов: РНК ВЖЛ

штамма 17D и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) штамма 205, ДНК человека. Отрицательным контролем служила вода очищенная.

Результаты

При сравнении геномов различных штаммов ВЖЛ был подобран комплект из 4 праймеров (F3-У, В3-У, FIP-У и VIP-У), соответствующих фрагменту гена NS1 ВЖЛ. С использованием праймеров F3-У и В3-У амплифицирован фрагмент кДНК ВЖЛ и получена рекомбинантная плаزمиды рCR2.1-УF, содержащая фрагмент гена NS1 ВЖЛ длиной 181 нуклеотид. В результате проведения изотермической амплификации с 10-кратным разведением рекомбинантной плазмиды рCR2.1-УF была определена аналитическая чувствительность анализа, которая составила 10^4 копий/мл (см. рисунок). Оценка специфичности набора реагентов показала наличие положительного сигнала по каналу FAM в пробе, содержащей РНК ВЖЛ штамма 17D и отсутствие сигнала в пробах, содержащих РНК ВКЭ и ДНК человека.



Результат анализа аналитической чувствительности изотермической реакции с серийными 10-кратными разведениями плазмидной ДНК рCR2.1-УF от 10^{10} до 10^1 копий/мл. В качестве отрицательных контролей использовали ДНК человека и воду очищенную. Измерение флуоресценции проводили по каналу FAM

Заключение

В работе получен экспериментальный набор реагентов для выявления РНК ВЖЛ методом изотермической амплификации. Испытание набора реагентов показали, что аналитическая чувствительность составила 10^4 копий/мл при 100%-й диагностической специфичности. Данный анализ, после прохождения государственной регистрации, может быть полезен при лабораторной верификации диагноза и выявлении ВЖЛ у комаров-переносчиков для изучения распространения возбудителя как в эндемичных, так и в неэндемичных районах.

Литература

1. GenBank. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-93

ПРОТОТИП МИКРОКАПЕЛЬНОГО ХИМИЧЕСКОГО РЕАКТОРА***PROTOTYPE OF A MICRODROPLET CHEMICAL REACTOR**Д. О. Кулешов^{1,3}, И. А. Громов², А. А. Дьяченко²¹*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*²*Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург*³*ООО «Микрокапельные технологии», Санкт-Петербург*D. O. Kuleshov^{1,3}, I. A. Gromov², A. A. Dyachenko²¹*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg*²*Ioffe Physical-Technical Institute RAS, Saint Petersburg*³*Microdroplet Technologies, LLC, Saint Petersburg*

✉ microdroplets@yandex.ru

Аннотация

В настоящее время активно развивается новый метод химического синтеза, предполагающий проведение химических реакций в микрокаплях. Основным препятствием для внедрения в практику микрокапельного химического синтеза является его низкая производительность. В настоящей работе описан прототип микрокапельного химического реактора, работающего на основе электрораспыления и позволяющего значительно увеличить производительность микрокапельного химического синтеза.

Abstract

A new method of chemical synthesis based on carrying out of chemical reactions in microdroplets is currently being actively developed. Low productivity of microdroplet chemical synthesis is the main obstacle for its practical use. A prototype of a microdroplet chemical reactor operating on the basis of electrospray and allowing a significant increase in the productivity of microdroplet chemical synthesis is described in this paper.

Развитие фармацевтики невозможно без создания новых методов химического синтеза, позволяющих ускорить синтез целевых биологически активных соединений. В настоящее время активно развивается новый метод химического синтеза, предполагающий проведение химических реакций в микро- и нанокляпях, в том числе и заряженных [1, 2]. Показана высокая эффективность использования микрокапель для проведения в них химических реакций, что выражается в значительном ускорении химических реакций по сравнению с их протеканием в «объеме» [1, 2], а также в изменении характера протекания реакций, что делает возможным получение веществ, синтез которых с использованием имеющихся методов синтеза крайне затруднен [3]. Основным препятствием для широкого внедрения в практику микрокапельного химического синтеза является его низкая производительность.

Использование электрораспыления для генерации микро- и наноклапель из растворов реагирующих веществ позволяет увеличить производительность микрокапельного синтеза за счет увеличения количества распылительных капилляров, а также увеличения объема распыляемой жидкости. В процессе электрораспыления растворов образуются либо положительно заряженные, либо отрицательно заряженные микро- и наноклапли. Наличие заряда у капли является значительным преимуществом электрораспыления перед другими методами генерации микрокапель, так как открывает широкие возможности для управления параметрами микрокапли, такими как время жизни, размер, траектория движения.

Нами разработан и изготовлен прототип микрокапельного химического реактора, в основе работы которого лежит генерация положительно и отрицательно заряженных микро- и наноклапель из растворов реагирующих веществ при помощи электрораспыления. Устройство состоит из двух основных блоков: реакторного блока и блока электроники. Реакторный блок включает в себя перистальтические насосы, предназначенные для ввода реакционной смеси, устройство ввода нагревающего газа и непосредственно реакторное устройство. Реакторное устройство выполнено в виде фторопластового цилиндра и состоит из двух основных частей: мультикапиллярной распылительной системы и системы пробосбора. Ключевым инновационным элементом разработанного устройства является мультикапиллярная распылительная система. Мультикапиллярная система состоит из трех

* Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям (договор № 4732ГС1/79601 от 27.09.2022).

© Д. О. Кулешов, И. А. Громов, А. А. Дьяченко, 2023

основных модулей: модуля ввода газа (МВГ), модуля ввода реакционной смеси (МВРС) и модуля транспортного противозлектрода (МТП). МВРС состоит из четырех подмодулей. Каждый из них имеет промежуточный объем ~ 2,6 мл, через который вводится распыляемая смесь в четыре распылительных капилляра из нержавеющей стали с помощью перистальтического насоса. Наружный диаметр капилляра равен 0,4 мм, а внутренний ~ 0,2 мм. Подмодули присоединяются к МВГ через резиновое уплотнение. МВГ состоит из 16 капилляров, закрепленных в основании модуля ввода газа, имеющего диаметр 150 мм. Наружный диаметр капилляра равен 0,8 мм, а внутренний ~ 0,5 мм. Транспортный электрод представляет собой круг из нержавеющей стали диаметром 150 мм. Он имеет 16 отверстий одинакового диаметра (23 мм), которые соосны с капиллярами. Распыляющая разность потенциалов создается между капиллярами и транспортным противозлектродом и может принимать значения от -5 до 5 кВ. Конструкция мультикапиллярной распылительной системы позволяет распылять до 10 мл жидкости в минуту в режиме Gas Assisted Electrospray. Система пробосбора включает в себя кювету из диэлектрического материала, на дно которой помещен электрод из коррозионностойкого металла, и рассчитана на 10 мин непрерывного распыления. Накопление целевых химических веществ происходит на металлическом коллекторе. Разработанная система пробосбора позволяет менять расстояние от места генерации заряженных микрокапель до места их осаждения в диапазоне от 30 до 110 мм, что позволяет управлять временем их жизни. Управление параметрами работы реакторного блока и его электропитание осуществляются с помощью блока электроники.

Литература

1. Yan X. Emerging microdroplet chemistry for synthesis and analysis // International Journal of Mass Spectrometry. 2021. Vol. 468. P. 116639.
2. Wei Z. et al. Accelerated reaction kinetics in microdroplets: Overview and recent developments // Annual Review of Physical Chemistry. 2020. Vol. 71. P. 31–51.
3. Kuleshov D. O., Mazur D. M., Gromov I. A. et al. Study of the Aniline and Acetone Condensation Reaction under Electrospray Ionization Conditions, Journal of Analytical Chemistry. 2020. Vol. 75 (13). P. 1647–1652.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-94

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АРМИРОВАННОЙ РНК DEVELOPMENT OF RECOMBINANT BACTERIOPHAGES FOR THE PRODUCTION OF REINFORCED RNA

В. В. Куликов¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}, Н. В. Волкова²

¹Алтайский государственный университет, Барнаул

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

V. V. Kulikov¹, D. N. Shcherbakov^{1,2}, N. V. Volkova²

¹Altai State University, Barnaul

²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ coolervvk@gmail.com

Аннотация

Нами была разработана система для конструирования рекомбинантных бактериофагов MS2. Данная технология дает возможность получать бактериофаги, имеющие заданные последовательности РНК, что позволяет производить стабильно хранящуюся, РНКазо-резистентную РНК для дальнейшего использования в высокочувствительных аналитических методах в качестве контрольных образцов либо в иных задачах, требующих защищенной РНК.

Abstract

We have developed a system for the construction of recombinant bacteriophages MS2, this technology makes it possible to obtain bacteriophages with specified RNA sequences, which allows us to produce stably stored, RNase-resistant RNA for further use in highly sensitive analytical methods, as control samples, or in other tasks requiring protected RNA.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) является одним из наиболее эффективных методов диагностики РНК-содержащих вирусов. Одной из проблем при постановке ОТ-ПЦР является использование адекватных контролей. Одним из способов защиты РНК при создании контролей является технология «армированной РНК». Армированная РНК — это подход, основанный на использовании рекомбинантных вирусных частиц бактериофага MS2. РНК из подобных частиц может быть легко извлечена и может функционировать как инструмент для валидации всех этапов процесса, от экстракции до амплификации всех мишеней при постановке ОТ-ПЦР [1]. Таким образом, вирусные частицы MS2 безопасны в лабораторных условиях, что позволяет избежать риска для сотрудников, а также фаги эффективны в качестве положительного контроля, что делает их эффективными для коммерческого применения.

Целью исследования было конструирование специфичного положительного внешнего контроля, полученного на основе рекомбинантных бактериофагов MS2 с применением генно-инженерных методов, для специфического использования в анализах ОТ-ПЦР.

Внешний контроль, полученный из бактериофага MS2, был сконструирован с использованием последовательностей из генома SARS-CoV-2.

Посредством полимеразной цепной реакции на матрице плазмиды pсDNA3.1-S (содержит последовательность спайкового белок-вируса SARS-CoV-2 варианта Wuhan) был наработан ампликон, соответствующий фрагменту (319-869 а. о.) последовательности спайкового белок-вируса SARS-CoV-2. Праймеры для ПЦР содержали с своим составе несущие сайты рестрикции AhoI и Bsp1720I. Полученный фрагмент был встроен в вектор pMB2 по уникальным сайтам рестрикции AhoI и Bsp1720I. Для подтверждения структуры плазмиды было проведено секвенирование по Сенгеру. После трансформации клеток *E. coli* полученной плазмидой pMB2-Sprot была проведена наработка рекомбинантных фаговых частиц.

Таким образом, полученный нами вектор pMB2-Sprot является эффективной экспрессионной системой для получения вирусоподобных частиц внешнего контроля.

Литература

1. Borghetti I.A., Zambenedetti M.R., Requião L. et al. External Control Viral-Like Particle Construction for Detection of Emergent Arboviruses by Real-Time Reverse-Transcription PCR // Biomed. Res. Int. 2019. P. 2560401.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-95

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ЭНДОЛИЗИНА PLY57
И ПОЛИ-ГАММА-D-ГЛУТАМАТ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ ENV D*

PRODUCTION OF RECOMBINANT FUSION PROTEINS BASED ON ENDOLYSIN PLY57
AND POLY-GAMMA-D-GLUTAMATE DEPOLYMERASE ENV D

В. А. Кулябин, А. В. Скорынина, А. М. Шадрин

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрябина РАН, Пуццо*

V.A. Kuliabin, A. V. Skorynina, A. M. Shadrin

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino

✉ unicorn.vlad@gmail.com

Аннотация

Эндолизины бактериофагов, разрушающие клеточную стенку грамположительных бактерий, а также деполимеразы, гидролизующие их капсульные полисахариды, выступают в качестве потенциальных антимикробных агентов, а создание гибридного белка, объединяющего две функции, является перспективным способом борьбы с опасными мультирезистентными штаммами.

Abstract

Endolysins that destroy the cell wall of gram-positive bacteria, and depolymerases that hydrolyze the polysaccharide capsule act as potential antimicrobial agents. Creation of a fusion protein combining two functions is a promising way to combat dangerous multi-resistant strains of bacteria.

Группа грамположительных и спорообразующих бактерий *B. cereus sensu lato* широко представлена в различных экологических нишах и включает в себя различные патогены человека и животных, например возбудитель сибирской язвы *B. anthracis*. Увеличение бактериальной устойчивости к антибиотикам бросает вызов к изучению альтернативных способов борьбы с бактериальной инфекцией. Данный фактор стал поводом для возрождения во всем мире интереса к изучению фагов и их белков.

Эндолизины, кодируемые фагами, разрушают пептидогликан, они необходимы для лизиса клеточной стенки хозяина, при этом обладают различными ферментативными активностями. Эндолизин Ply57 бактериофага Izhevsk обладает активностью широкого спектра действия в отношении *B. cereus sensu lato*, а также высокой термостабильностью, что делает его полезной платформой для разработки антибактериальных средств и средств борьбы с патогенами для предотвращения бактериальной контаминации, вызываемой бактериями группы *B. cereus*, включая *B. anthracis* [1].

Ряд бактерий, в свою очередь, обладает наличием капсулы — поверхностной структуры, залегающей поверх клеточной стенки и защищающей от внешних факторов и воздействий. У патогенных бактерий капсула является особым фактором вирулентности и защищает от действия иммунной системы. Кроме того, наличие полисахаридной капсулы препятствует взаимодействию белков с клеточной стенкой и мембраной, блокируя действия многих белков, таких как антитела и эндолизины. Деполимераза EnvD бактерии *P. noertemanii* гидролизует поли-гамма-D-глутаминовую кислоту (PDGA) капсул бактерий, разрушает капсулу *B. anthracis*, имеет высокую температурную стабильность, повышает эффективность действия антибиотиков [2].

В данной работе при помощи метода TEDA были получены плазмидные конструкции на основе вектора pET33, содержащие слитые гены *ply57*, *ply57EAD* и *envD*. В дальнейшем векторы трансформированы в экспрессионный штамм *E. coli* BL21 (DE) Star, и проверена способность штаммов индуцировать гибридный белок. В результате были отобраны два штамма *E. coli* BL21 (DE) Star *pET33_ply57_envD* и *E. coli* BL21 (DE) Star *pET33_ply57EAD_envD* для дальнейшего получения слитого белка.

Гибридные белки Ply57_envD и Ply57EAD_envD выделены из телец включения модифицированным методом с использованием мочевины с последующей ренатурацией в большом объеме буфера и итоговой очисткой при помощи металл-хелатной хроматографии. Была произведена проверка активности рекомбинант-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-15-00385.

© В. А. Кулябин, А. В. Скорынина, А. М. Шадрин, 2023

ных белков на предмет способности разрушать PDGA и влияния на рост клеточных культур. Было показано, что при сохранении деполимеразной активности пептидогликан-гидролазная функция гибридного белка снижается.

Полученные белки показывают двойную функцию, направленную на разрушение бактериальных клеток. Исследования в области использования антимикробных белков продолжаются, и ожидается, что эндолизины и деполимеразы или их слитые версии станут важным компонентом новых стратегий лечения инфекций, особенно в случае увеличения количества штаммов с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Литература

1. Skorynina A. V., Pilgrimova E. G., Kazantseva O. A. et al. Bacillus-infecting bacteriophage Izhevsk harbors thermostable endolysin with broad range specificity // Plos One. 2020. Vol. 15 (11). P. e0242657.
2. Negus D., Peter W T. A poly- γ -d-glutamic acid depolymerase that degrades the protective capsule of Bacillus anthracis // Molecular Microbiology. 2014. Vol. 91 (6). P. 1136-1147.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-96

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АДЪЮВАНТОВ
В СОСТАВЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХАНТАВИРУСНОЙ ВАКЦИНЫ****IMMUNOMODULATORY EFFECT OF ADJUVANTS IN THE EXPERIMENTAL HANTAVIRUS VACCINE**С. Курашова¹, М. Егорова¹, А. Ветрова^{1,2}, Р. Теодорович¹, А. Ишмухаметов^{1,2}, Е. Ткаченко¹, Т. Дзагурова¹¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М. П. Чумакова РАН, Москва²Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. СеченоваS. Kurashova¹, M. Egorova¹, A. Vetrova^{1,2}, R. Teodorovich¹, A. Ishmukhametov^{1,2}, E. Tkachenko¹, T. Dzagurova¹¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow²Sechenov First Moscow State Medical University

✉svetlanak886@yandex.ru

Аннотация

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — вирусный нетрансмиссивный зооноз, занимающий ведущее место в РФ среди природно-очаговых болезней человека. Ввиду отсутствия этиотропных препаратов для лечения данной инфекции особую важность приобретает разработка эффективной профилактической вакцины. С целью уменьшения количества антигена, повышения иммуногенности и снижения реактогенности оценивали адъюванты различного происхождения в составе экспериментальной вакцины против ГЛПС.

Abstract

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a viral non-transmissible zoonosis that occupies a leading position among natural focal human diseases in the Russian Federation. In view of the lack of etiotropic drugs for the treatment of this infection, the development of an effective preventive vaccine is of particular importance. In order to reduce the amount of antigen, increase the immunogenicity and reduce reactogenicity, we studied the adjuvants of various origins in the experimental vaccine against HFRS.

На модели мышей BALB/c была показана иммуномодулирующая эффективность 7 адъювантов различной природы в составе хантавирусного вакцинного препарата (ХВП): Ac3-S-LPS *Shigella sonnei*, смесь коротких и длинных О-полисахаридных доменов (ХВП-ЛПС-1/1) в концентрации 50 мкг/дозу; Ac3-S-LPS *S. Sonnei*, гомогенный длинноцепочечный вариант (ХВП-ЛПС) — 50 мкг/дозу [1]; Ac3-S-LPS *S. flexneri* 1B (ХВП-ЛПС/flex) — 50 мкг/дозу, ремоделированные сферические частицы Tobacco mosaic virus — 300 и 150 мкг/мл (ХВП-СЧ/300 и ХВП-СЧ/150), рекомбинантный термолабильный энтеротоксигенный белок В *Escherichia coli* — 7,5 и 0,2 мкг/мл (ХВП-ТЛБ/7.5 и ХВП-ТЛБ/0.2), SEPIVAC™SWE — эмульсия наноземульгированного сквалена животного происхождения по типу «масло в воде» (ХВП-SWE) — 100 мкг/дозу, гидроксид алюминия (ХВП-AL) — 500 мкг/мл. Вакцинный препарат вводили в мышечную ткань бедра экспериментальных животных дважды по 100 мкл с интервалом в две недели. Контрольной группе вводили физиологический раствор в том же объеме. Титры нАТ определяли методом РН/ФОЕ₅₀. Результаты представлены в виде среднегеометрических значений титра нАТ в двоичных логарифмах ± стандартное отклонение. Результаты экспериментов были проанализированы, сгенерированы и графически представлены в программе GraphPadPrism версия 9.4.0 (Калифорния, США). Определение уровня значимости различий между несколькими группами было выполнено с использованием непараметрического метода двустороннего дисперсионного анализа ANOVA.

Во всех экспериментальных группах наблюдалась индукция гуморального иммунного ответа. Была установлена прямая корреляция специфических IgG и нАТ. Наиболее значимое повышение иммуногенной активности наблюдалось в группах ХВП-ЛПС-(1/1), ХВП-СЧ/300, ХВП-ТЛБ/0.2, ХВП-SWE ($p < 0,0001$) и ХВП-СЧ/150 ($p = 0,0012$) по сравнению с ХВП (рис. 1). В группах ХВП-ЛПС, ХВП-ЛПС/flex и ХВП-AL не наблюдали статистически значимого усиления иммуногенной активности по сравнению с ХВП. При этом ХВП-ТЛБ/7,5 вызывал иммуносупрессию у мышей. Ac3-S-LPS *S. sonnei* в качестве адъюванта способствовал увеличению регуляторных цитокинов ИФН- γ , ИЛ-12 и на фоне усиления иммуногенной активности обеспечивал стабильность ХВП, хранившегося при температуре 6 ± 2 °C в течение 32 мес.

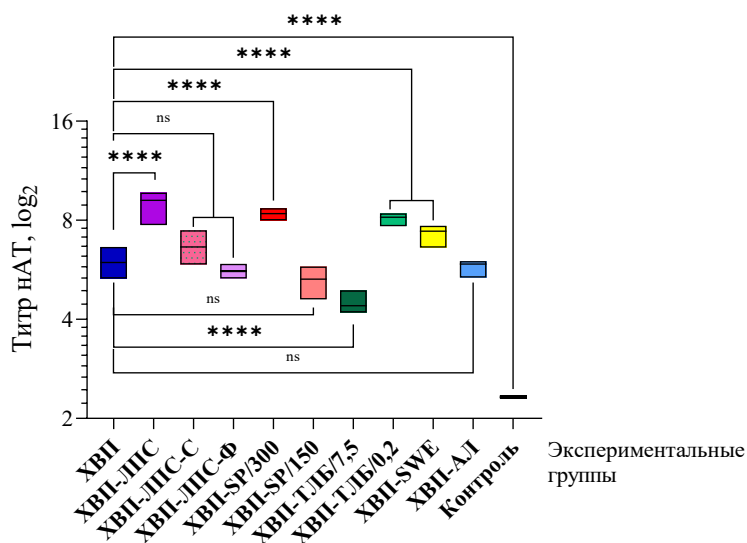


Рис. 1. Титр нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей BALB/c после двукратной иммунизации хантавирусным вакцинным препаратом

Сферические частицы Tobacco mosaic virus проявляли адъювантную активность в концентрации 300 мкг/мл, что существенно повышает концентрацию общего белка в вакцинном препарате. Термолabileный энтеротоксигенный белок В *E. coli* индуцировал провоспалительный ИЛ-1 β . В связи с этим два последних адъюванта были исключены из дальнейших исследований.

Следует отметить, что введение как одного адъюванта термолabileного энтеротоксина Б мышам BALB/c в дозе 7,5 мкг/мл (К-ТЛБ/7,5), так и адъюванта в составе экспериментального препарата ХВП-ТЛБ/7,5 сопровождалось, помимо повышения уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , другими токсическими проявлениями (рис. 2).

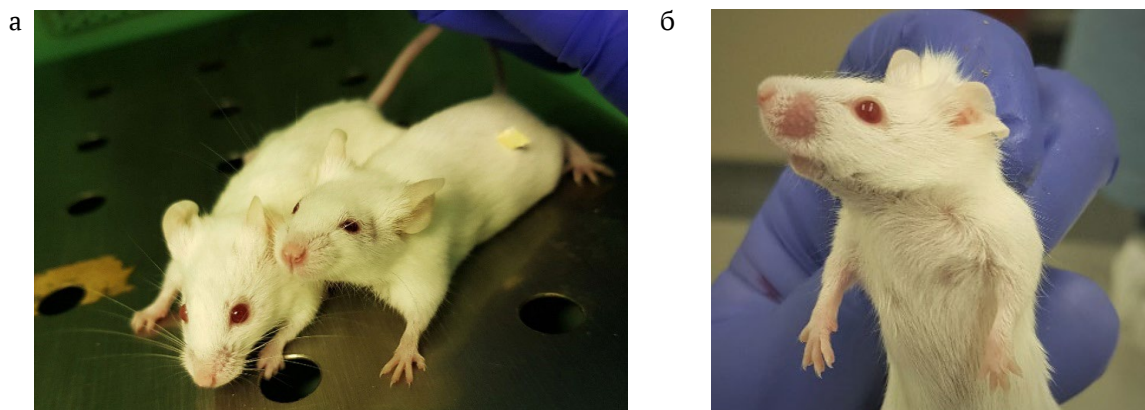


Рис. 2. Проявления токсичности адъюванта термолabileного энтеротоксина Б после иммунизации мышей BALB/c экспериментальной вакциной ХВП-ТЛБ/7,5. Токсический эффект наблюдался у экспериментальных животных в виде потери усов и частичного выпадения шерстного покрова; а — интактные мыши, б — после 2 иммунизаций

Обобщая результаты испытания адъювантов, можно сделать вывод, что наиболее перспективными в составе исследованного нами вакцинного препарата против ГЛПС можно считать низкоэндогенный липополисахарид Ac3-S-LPS *S. sonnei* и SWE. Их применение в дозах 50 и 100 мкг/дозу соответственно способствовало увеличению титра нейтрализующих антител, а также регуляторных цитокинов ИФН- γ и ИЛ-12, что является показателем формирования как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

В исследовании также было показано, что после трех иммунизаций мышей экспериментальными вакцинными препаратами иммуногенная активность (титр вирус нейтрализующих антител, а также ИФН- γ и ИЛ-12) статистически достоверно не изменялась по сравнению с двукратной иммунизацией. Исходя из этого, целесообразно проведение двукратной иммунизации для контроля иммуногенной активности вакцин против ГЛПС.

Литература

1. Kurashova S. S. et al. Various adjuvants effect on immunogenicity of Puumala virus vaccine // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020. Vol. 10. P. 545371.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-97

**ХИМИЧЕСКИЙ ДИЗАЙН СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ
НА ОСНОВЕ ЛИПИДНО-ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ НА ПРИМЕРЕ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И АНТИФИБРОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ***

**CHEMICAL DESIGN OF DRUG DELIVERY SYSTEMS BASED ON LIPID-POLYMER CARRIERS
ON THE EXAMPLE OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFIBROTIC DRUGS**

И. М. Ле-Дейген, П. В. Мамаева, А. С. Сафронова, А. А. Скуредина, И. М. Колмогоров, Е. В. Кудряшова

Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

I. M. Le-Deuygen, P. V. Mamaeva, A. S. Safronova, A. A. Skuredina, I. M. Kolmogorov, E. V. Kudryashova

Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University

✉ i.m.deygen@gmail.com

Аннотация

В работе предложен подход к химическому дизайну систем доставки антифибротических (пирфенидон, нинтенданиб) препаратов и фторхинолонов (левофлоксацин, моксифлоксацин) на основе комплексов липосомальных форм с полиэлектролитами на примере производных хитозана. Системы всесторонне изучены *in silico*, а также протестированы *in vivo* при эндотрахеальном введении мышам.

Abstract

Here we propose an approach to the chemical design of delivery systems for antifibrotic (pirfenidone, nintendanib) drugs and fluoroquinolones (levofloxacin, moxifloxacin) based on complexes of liposomal forms with polyelectrolytes using chitosan derivatives as an example. The systems have been extensively studied *in silico* and also tested *in vivo* when administered endotracheally to mice.

На сегодняшний день как в России, так и в мире остро стоит проблема терапии заболеваний дыхательных путей. Пандемия COVID-19 привела к резкому росту заболеваемости вторичными пневмониями, в том числе вызванными внутрибольничными резистентными штаммами патогенных бактерий. Более того, тяжелое течение COVID-19, связанное с искусственной вентиляцией легких, приводит к развитию постковидного легочного фиброза, значительно снижающего качество жизни пациентов после выписки из стационара.

В настоящей работе предложен подход к созданию ингаляционных систем доставки антибактериальных препаратов класса фторхинолонов (левофлоксацина и моксифлоксацина), а также антифибротических препаратов на примере пирфенидона и нинтенданиба на основе комплексов липосомальных форм препаратов с маннозиллированным хитозаном. Системы доставки лекарственных препаратов на основе липосом обладают повышенной биодоступностью за счет сродства к легочному сурфактанту, а модификация производными хитозана придает системе мукоадгезивные свойства. Эти свойства, наряду с размером частиц, подходящим для доставки в альвеолы, позволяют обеспечить высокую эффективность включения лекарственных формуляций в легких для эффективной терапии.

С помощью метода ИК-спектроскопии Фурье в режиме НПВО и УФ-спектроскопии мы исследовали влияние структуры активной молекулы и липидного состава везикул на структурно-функциональные свойства липосомальных форм препаратов. В работе рассматривались липосомы состава дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) 100 % с добавкой 10, 20 и 30 масс.% кардиолипина или с добавкой 10 масс.% холестерина. Определяли эффективность загрузки, выявляли основные сайты связывания лекарств при комнатной температуре, а также влияние включения препарата на фазовый переход везикул. Для моксифлоксацина показано, что образование электростатического комплекса препарат — бислоем значительно влияет на структуру и фазовый переход липосом. Показано влияние левофлоксацина на полярные группы фосфолипидов, приводящее к стабилизации полученных систем и изменению характера протекания процесса фазового перехода. Выявлено существование взаимодействий между пиридиновым кольцом пирфенидона и фосфатными группами КЛ. Показано влияние пирфенидона на фазовый переход системы ДПФХ КЛ 20 %. Обнаруженная повышенная стабильность полученных систем при

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для молодых кандидатов наук (№ 07515-2022-297) и при поддержке Программы развития МГУ ПНР 5.13.

© И. М. Ле-Дейген, П. В. Мамаева, А. С. Сафронова, А. А. Скуредина, И. М. Колмогоров, Е. В. Кудряшова, 2023

водит к пролонгированному высвобождению из липосом *in vitro*, подчиняющемуся диффузионному контролю. Впервые показано интенсивное взаимодействие нинтеданиба с везикулами ДПФХ 100 %. Выявлено, что 10%-я добавка холестерина нивелирует электростатические эффекты, возникающие между положительно заряженными структурными единицами лекарственных молекул и анионными группами липидов.

Изучение фармакокинетических параметров и биораспределения липосомальных форм моксифлоксацина проводили в сравнении с контрольным (внутривенным и эндотрахеальным). Пробоподготовку проводили по технологии QuEChERS, позволяющей быстро извлечь остаточные количества органических соединений из биопроб. Внутривенное введение моксифлоксацина характеризуется типичной для этого способа введения препарата кривой. Для эндотрахеального введения использовали модель с всасыванием; липосомальная форма обеспечивает более медленное поступление препарата в кровь, что связано с преимущественным накоплением в легких и более медленным высвобождением содержимого.

Сравнивали биораспределение препаратов в легких и трахее. При внутривенном введении препараты быстро попадали в легкие и в трахею в небольших концентрациях, а затем быстро, в течение в среднем 90 мин элиминировались. При введении эндотрахеально свободных препаратов сразу обнаруживалось большое количество в трахее, а до легких доходило значительно меньше. Напротив, при введении липосомальных препаратов наблюдается замедленное высвобождение содержимого. Максимальные концентрации препаратов достигается спустя 1140–4250 ч после введения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-98

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ МИКРОБНЫХ
ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* ВКМ
В-2188D И РАСТЕНИЯ *LEMNA MINOR****

**ELECTROCHEMICAL PARAMETERS OF PLANT MICROBIAL FUEL CELLS BASED
ON BACTERIA *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* ВКМ В-2188D AND PLANT *LEMNA MINOR***

Р. В. Лепикаш, Д. Г. Лаврова

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, Тульский государственный университет

R. V. Lepikash, D. G. Lavrova

Laboratory of Environmental and Medical Biotechnology, Tula State University

✉ mr.romalep@yandex.ru

Аннотация

В работе определены электрохимические параметры систем растительных микробных топливных элементов (РМТЭ). Приведено сравнение характеристик систем РМТЭ с электродами на основе различных углеродных материалов.

Abstract

The electrochemical parameters of plant microbial fuel cells were determined. The characteristics of systems were compared, the electrode of which were made of different carbon materials.

С увеличением экологических проблем в мире возникает необходимость использования «зеленых» и ресурсосберегающих технологий, которые позволяют снизить антропогенную нагрузку на экосистемы. Перспективной технологией, предназначенной для выработки электроэнергии и очистки сточных вод, является растительный микробный топливный элемент (РМТЭ).

Выработка электроэнергии в системах РМТЭ обусловлена протекающими окислительно-восстановительными процессами на аноде и катоде. В ходе окисления корневых экссудатов растений микроорганизмами образуются электроны, которые переносятся на анод. При замыкании цепи электроны движутся к катоду, где происходит процесс восстановления кислорода до воды. В результате описанных процессов образуется электрический ток.

При подборе микробного биокатализатора следует учитывать электроактивные свойства микроорганизмов, которые обусловлены способностью передавать электроны на анод. Кроме того, на электрохимические параметры ячейки влияет материал электродов.

В связи с этим целью данного исследования являлось определение влияния анодного материала на параметры генерации электроэнергии в системах РМТЭ на основе бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-2188D и растения *Lemna minor* при очистке модельных сточных вод от анионных поверхностно-активных веществ.

В качестве микроорганизмов были выбраны бактерии *Pseudomonas chlororaphis*, которые способны продуцировать экзоэлектрогенные соединения — феназины, являющиеся медиаторами электронного транспорта. Выбор углеродного войлока и волокна для изготовления электродов был обусловлен низкой токсичностью подобных материалов и высокой площадью поверхности. Растение *Lemna minor* (ряска малая) обладает высокой скоростью роста и используется в фиторемедиации. В качестве модельного АПАВ использовали додецилсульфат натрия (ДДС), который является одним из компонентов большинства моющих средств.

Для выбора оптимальной концентрации ДДС, при которой будет гарантирована работа системы, проводили тестирование на угнетение скорости роста ряски согласно методике [1] (табл. 1).

Таблица 1

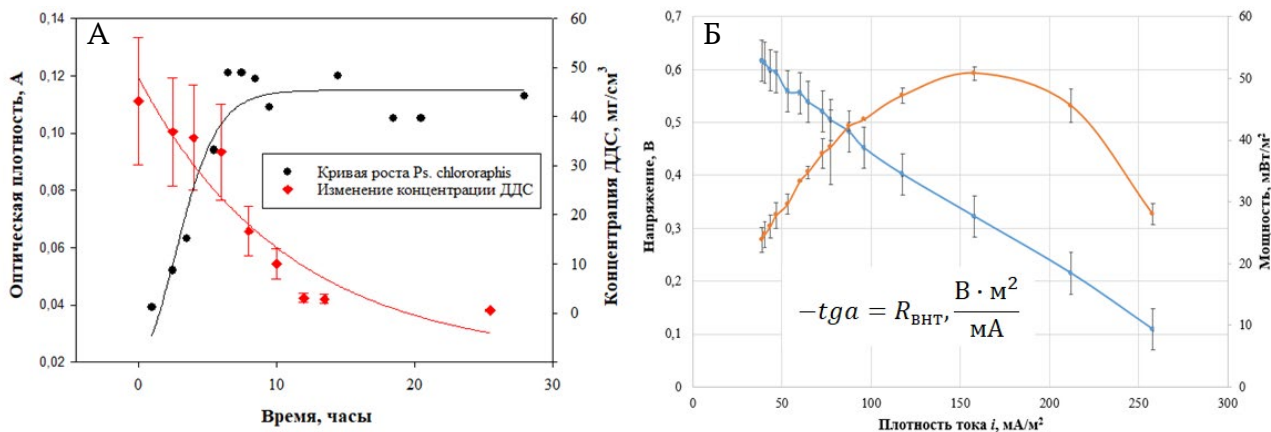
Результаты биотестирования *Lemna minor*

Концентрация ДДС, мг/дм ³	0,5	5	50	250
Индекс ингибирования, %	13,9	17,9	27,9	62,8

* 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).

Таким образом, при концентрации ДДС до 50 мг/дм^3 можно ожидать сохранения функционирования РМТЭ. При увеличении концентрации может происходить гибель растений, что негативно скажется на работе системы РМТЭ.

Способность к биодegradации ДДС (см. рисунок, А) определяли при культивировании бактерий *Ps. chlororaphis* на среде Эванса, в которой в качестве единственного источника углерода использовали ДДС в концентрации 50 мг/дм^3 (100 ПДК). Определение ДДС проводили согласно методике [2].



А — кривая роста бактерий *Ps. chlororaphis* при добавлении ДДС, Б — поляризационная кривая системы РМТЭ

Для исследуемых систем РМТЭ ежедневно измеряли потенциал разомкнутой цепи (E_{OCP} , мВ) и силу тока короткого замыкания ($I_{кз}$, мА), по поляризационным кривым (см. рисунок, Б) определяли удельную мощность (P , мВт/м²) и внутреннее сопротивление ($R_{внт}$, Ом). Максимальные значения измеряемых параметров представлены в табл. 2.

Таблица 2

Электрохимические параметры исследуемых систем

Параметр	Тип системы			
	Войлок		Волокно	
	Контроль	ДДС	Контроль	ДДС
E_{OCP} , мВ	840 ± 40	760 ± 20	690 ± 50	540 ± 40
$I_{кз}$, мА	$2,0 \pm 0,2$	$2,19 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
P , мВт/м²	51 ± 2	56 ± 7	14 ± 1	12 ± 4
$R_{внт}$, Ом	460 ± 40	440 ± 30	900 ± 70	600 ± 50
Степень удаления ДДС, %	99 %		99 %	

Таким образом, использование углеродного войлока в качестве материала для электродов в системах РМТЭ демонстрирует более высокие значения удельной мощности, потенциала и силы тока по сравнению с электродами на основе волокна, что может быть обусловлено более развитой поверхностью войлока, которая облегчает адгезию микроорганизмов на его поверхности. Во всех системах степень удаления АПАВ составляет 99 % за 7 суток, при этом использование ДДС в концентрации 50 мг/дм^3 обеспечивает функционирование системы и не оказывает высокого ингибирующего воздействия на биологические компоненты РМТЭ.

Литература

- ГОСТ 32426-201. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Испытание ряски на угнетение роста. М. 2013. 6 с.
- Hayashi K. A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue // Analytical Biochemistry. 1975. Vol. 67, № 2. P. 503–506.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-99

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА ПОДТИПА А/Н5N8*

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF AN EXPERIMENTAL DNA VACCINE ENCODING A/H5N8 INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ

В. Р. Литвинова, А. П. Рудомётов, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова,
М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, А. М. Задорожный, Н. Б. Рудомётова,
А. А. Фандо, Е. В. Тигеева, В. А. Яковлев, К. И. Иванова,
В. Ю. Марченко, Т. Н. Ильичева, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

V. R. Litvinova, A. P. Rudometov, D. N. Kisakov, L. A. Kisakova,
M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, A. M. Zadorozhny, N. B. Rudometova,
A. A. Fando, E. V. Tigeeva, V. A. Yakovlev, K. I. Ivanova,
V. Yu. Marchenko, T. N. Ilyicheva, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

Аннотация

Постоянно возникающие антигенные варианты сезонных вирусов гриппа, а также высокая вероятность появления пандемичных штаммов усиливают необходимость в новых вакцинных технологиях, которые будут обеспечивать эффективную индукцию иммунного ответа и обладать масштабируемым производством с возможностью замены целевого иммуногена. В данной работе была разработана экспериментальная ДНК-вакцина, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа подтипа А/Н5N8, и исследованы ее иммуногенные свойства.

Abstract

The constantly emerging antigenic variants of seasonal influenza viruses, as well as the high likelihood of the emergence of pandemic strains, increase the need for new vaccine technologies that will provide effective induction of the immune response and have scalable production with the ability to replace the target immunogen. In this work, an experimental DNA vaccine encoding A/H5N8 influenza virus hemagglutinin was developed and its immunogenic properties were studied.

Совместная циркуляция различных подтипов вирусов гриппа А может приводить к появлению новых штаммов, патогенных для человека. В последние годы происходит все больше случаев заражения людей вирусом гриппа птиц подтипов Н5, Н7, Н9 и Н10. В 2021 г. в России были впервые зафиксированы случаи заражения людей птичьим гриппом подтипа Н5N8. Для быстрого реагирования на появляющиеся новые штаммы вируса гриппа возможно использование вакцин на основе нуклеиновых кислот. Важными преимуществами ДНК-вакцин являются скорость и низкая стоимость их производства, а также более высокий уровень безопасности. Известно, что ДНК-вакцины стабильны даже при комнатной температуре, что упрощает процесс их получения и условия хранения. Производство ДНК-вакцин также позволяет избежать потенциальных рисков, связанных с работой с живыми патогенами. Кроме того, важной особенностью является способность активизировать специфические клеточный и гуморальный иммунные ответы.

Цель работы состояла в получении экспериментальной ДНК-вакцины, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа подтипа А/Н5N8, и исследовании ее иммуногенных свойств.

В ходе работы была разработана и получена ДНК-конструкция под названием рVAX-Н5, кодирующая полноразмерный гемагглютинин вируса гриппа А/turkey/Stavropol/320-01/2020 (Н5N8) с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4 на С-конце. С помощью трансфекции клеточной линии НЕК293, последующего вестерн-блот анализа и ОТ-ПЦР была показана экспрессия целевого гена в составе полученной конструкции. После этого была проведена двукратная иммунизация с интервалом в 3 недели мышей линии BALB/с полученной ДНК-конструкцией методом струйной инъекции (доза составляла 100 мкг в объеме 50 мкл). На 14-е сутки после

* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© В. Р. Литвинова, А. П. Рудомётов, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, А. М. Задорожный, Н. Б. Рудомётова, А. А. Фандо, Е. В. Тигеева, В. А. Яковлев, К. И. Иванова, В. Ю. Марченко, Т. Н. Ильичева, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв, 2023

второй иммунизации сыворотки крови иммунизированных животных были исследованы на наличие специфических антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Средний титр специфических антител в группе животных, иммунизированных pVAX-H5, составил $1 : 1 \times 10^5$.

Для анализа возможности экспериментальной ДНК-вакцины вызывать специфический клеточный иммунный ответ на 14-е сутки после второй иммунизации у мышей извлекали селезенки и гомогенизировали их для исследования с помощью метода ELISpot. Иммунный ответ анализировали, исходя из возможности спленоцитов выделять IFN- γ в ответ на стимуляцию пептидами, входящими в состав гемагглютинина. С помощью ELISpot было установлено, что в группе, иммунизированной экспериментальной ДНК-вакциной pVAX-H5, индуцируется специфический клеточный иммунный ответ, что выражается в значительном повышении количества лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ .

Также сыворотки иммунизированных мышей исследовали в реакции вируснейтрализации на культуре клеток MDCK. В результате было показано, что сыворотки животных, иммунизированных pVAX-H5, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8).

Таким образом, показано, что разработанная ДНК-вакцина pVAX-H5 индуцирует формирование вирус-специфического гуморального и специфического клеточного ответов у иммунизированных животных. Также установлено, что антитела в сыворотках иммунизированных животных обладают вируснейтрализующей активностью *in vitro*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-100

ВЛИЯНИЕ ГЕНА SP-D НА СИНТЕЗ HSP70 В РЕПРОГРАММИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ**EFFECT OF THE SP-D GENE ON HSP70 SYNTHESIS IN MACROPHAGES AFTER REPROGRAMMING**

С. В. Лямина, С. В. Калиш

*Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова
Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Москва*

S. V. Lyamina, S. V. Kalish

*Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow***Аннотация**

Учитывая данные о значимом влиянии SP-D на локальный иммунный ответ в легких, на основании его внелегочных эффектов предполагается существенное влияние SP-D на системный иммунный и воспалительный ответ. Особый интерес вызывают влияние SP-D на синтез стресс-белков и проверка гипотезы фенотип-зависимости этих эффектов для ключевых клеток системы врожденного иммунитета — макрофагов.

Abstract

Based on the data of significant Sp-D effect on the local immune response in the lungs and its extrapulmonary effects, we expect the SP-D effect on the systemic immune and inflammatory response. The effect of SP-D on the synthesis of stress proteins and testing the hypothesis of the phenotype-dependence of these effects for macrophages, key cells of the innate immunity system is of particular interest.

Роль макрофагов различных фенотипов в процессах презентации антигенов в последнее время активно обсуждается, в том числе и с позиции влияния факторов микроокружения, учитывая существенную вариабельность макрофагальных фенотипов и уже доказанный факт существования фенотипического континуума клеток. В зависимости от микроокружения макрофаги могут альтернативно приобретать или провоспалительный M1, или противовоспалительный M2 фенотип. В очаге воспаления макрофаги активируют синтез собственных внутриклеточных защитных стресс — белков HSP70. Индукция HSP70 представляет собой ключевой маркерный компонент так называемого стресс-ответа, являющегося элементом протекции макрофагов от некроза и апоптоза, индуцируемого различными воспалительными медиаторами. Таким образом, способность макрофагов к индукции HSP70 может определять иммунологическую активность клеток в очаге воспаления. Очевидно, что факторы, которые могут влиять на процесс формирования фенотипа макрофагов, на их секреторную активность и способность к индукции HSP70, представляют кардинальный интерес для современной иммунологии и медицины. Одним из таких факторов является компонент сурфактанта — сурфактантный белок D (SP-D).

Цель работы заключалась в определении влияния SP-D на способность макрофагов к индукции стресс-белков HSP70 и проверке гипотезы о фенотип-зависимости этого эффекта.

Материалы и методы

C57BL/6 мыши, не имеющие SP-D гена (SP-D (-/-)), были получены в лаборатории S. Nawgood (США) и переданы исследователям. Сопоставимые по возрасту (8–10 недель) C57BL/6 мыши были использованы в качестве контроля (получены в виварии «Андреевка», Россия). Мыши содержались в условиях аккредитованного вивария, не допускающих попадание патогенных микроорганизмов, в соответствии с протоколом Комиссии по содержанию животных. Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеального смыва контрольных и SP-D (-/-) мышей, которым за 4 дня вводили в/б 2 мл 4%-го бульона тиогликолята. Перитонеальные макрофаги культивировали в среде RPMI 1640 с 10%-й сывороткой с 100 У/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в 48 луночных планшетах, по $0,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Для получения M1 и M2 фенотипов макрофагов была использована методика Zhang and Morrison. Для подтверждения феномена репрограммирования макрофагов оценивали продукцию маркерного для M1 фенотипа интерлейкина 12 (IL-12) и маркерного для M2 фенотипа IL-10. Для измерения цитокинов 200 мкл культуральной среды замораживали при -800°C . Оценку содержания

IL-12 и IL-10 проводили с помощью SearchLight® Technology multiplex cytokine assay (Pierce Biotechnology, Woburn, MA). Результаты представляли как M + CO и обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Отличие между группами считалось достоверным при $p < 0,05$.

Результаты

При сравнении степени ЛПС-индуцированного синтеза HSP70 в разных фенотипах перитонеальных макрофагов, выделенных от мышей генетической линии C57/BL6 и нокаутных по гену SP-D (-/-) мышей. Показано, что все три фенотипа макрофагов мышей C57/BL6 отвечали значительной активацией синтеза HSP70 на действие 500 нг/мл ЛПС без достоверных различий. Удаление гена SP-D привело к тому, что ЛПС-индуцированный синтез HSP70 в нативном M0 фенотипе был незначительно выше, в M1 фенотипе не изменялся, а в M2 фенотипе был более чем в 2 раза увеличен по сравнению с соответствующим фенотипом макрофагов мышей C57/BL6. При оценке продукции IL-10 выявлена четкая отрицательная корреляция с изменением синтеза HSP70 в разных фенотипах при удалении гена SP-D. Предположительно, повышение синтеза HSP70 в M2 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей было опосредовано снижением продукции IL-10. Это предположение поддерживают данные о том, что IL-10 действительно может угнетать индукцию HSP70.

Выводы

Полученные данные подтверждают вовлечение SP-D в регуляцию стресс-ответа макрофагов и отражают выраженную зависимость эффектов SP-D от фенотипа макрофагов. Повышение синтеза HSP70 в M2 фенотипе макрофагов SP-D (-/-) мышей, вероятно, опосредовано снижением продукции IL-10. Полученные данные подтверждают наличие особенностей регуляторных эффектов SP-D от фенотипа макрофагов и свидетельствуют о значимой роли белка в сопряжении и согласованной регуляции секреторной активности и клеточного стресс-ответа в макрофагах различных фенотипов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-101

АКТИВАЦИЯ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЦА***STIMULATION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS CHONDROGENIC DIFFERENTIATION FOR TISSUE ENGINEERING OF HYALINE CARTILAGE**Д. М. Марченко¹, М. С. Божокин^{1,2}, Е. Р. Михайлова¹, Ю. В. Сопова^{1,3,4}, М. Г. Хотин¹¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург²Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена, Санкт-Петербург³Санкт-Петербургский государственный университет⁴Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАНD. M. Marchenko¹, M. S. Bozhokin^{1,2}, E. R. Mikhailova¹, Yu. V. Sopova^{1,3,4}, M. G. Khotin¹¹Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg²Vreden National Medical Research Centre of Traumatology and Orthopedics, Saint Petersburg³Saint Petersburg State University⁴Vavilov Institute of General Genetics RAS, Saint Petersburg✉ berbimot@yandex.ru**Аннотация**

Работа посвящена возможности активации хондрогенной дифференцировки дермальных фибробластов человека с помощью рекомбинантных белков TGF-β3 и SOX9 и лентивирусных векторов, несущих последовательности генов *Tgf-β3* и *Sox9*. Было показано, что применение белка TGF-β3 и вектора с геном *Sox9* позволяет добиться повышения экспрессии генов, ассоциированных с хондрогенезом, в фибробластах.

Abstract

This work is devoted to the possibility of human dermal fibroblasts chondrogenic differentiation using the TGF-β3 and SOX9 recombinant proteins and lentiviral vectors carrying sequences of the *Tgf-β3* and *Sox9* genes. It has been shown that the use of the TGF-β3 protein and vector with the *Sox9* gene makes it possible to increase the expression of associated with chondrogenesis genes in fibroblasts.

Гиалиновый хрящ, выстилающий поверхности крупных суставов, имеет ограниченную способность к регенерации [1, 2]. Существующие в клинической практике методы, например хондропластика и микрофрактурирование, не решают проблему восстановления гиалинового слоя суставов в полном объеме. Следовательно, требуется поиск альтернативных решений. Таким решением может выступить создание тканеинженерных конструкций (ТИК), которые состоят из скаффолда и культуры клеток [3].

В качестве кандидата на роль клеточной культуры в тканевой инженерии гиалинового хряща была предложена культура дермальных фибробластов человека благодаря своей доступности, способности дифференцироваться в хондрогенном направлении и низкой иммуногенности [4, 5]. Одним из подходов в тканевой инженерии является активация дифференцировки клеток-предшественников различными стимулами. В качестве индукторов хондрогенеза в фибробластах были предложены две молекулы, которые играют важную роль в процессе формирования гиалинового хряща: транскрипционный фактор SOX9 и сигнальный белок TGF-β3 [6, 7].

Целью данной работы было изучение влияния экзогенных рекомбинантных белков TGF-β3 и SOX9 и сверхэкспрессии их генов на экспрессию генов, ассоциированных с хондрогенезом (*Tgf-β3*, *Col2a1*, *Acan*, *Comp*), в дермальных фибробластах человека.

Было обнаружено, что добавление в питательную среду рекомбинантного белка TGF-β3 вызывает значительный рост экспрессии генов, ассоциированных с хондрогенезом, в дермальных фибробластах человека через 21 сутки после воздействия. В то же время добавление рекомбинантного белка SOX9 не изменяет экспрессию анализируемых генов.

* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект № 15.БПК.21.0011 (соглашение № 075-15-2021-1063).

© Д. М. Марченко, М. С. Божокин, Е. Р. Михайлова, Ю. В. Сопова, М. Г. Хотин, 2023

Были получены лентивирусные частицы, несущие кодирующие последовательности генов *Tgf-β3* и *Sox9*. Трансдукция дермальных фибробластов полученными лентивирусами, содержащими последовательность гена *Sox9*, увеличивает экспрессию генов, ассоциированных с хондрогенезом, через 7 суток после воздействия. Напротив, трансдукция клеток вирусами, содержащими последовательность гена *Tgf-β3*, оказалась цитотоксичной и вызвала гибель фибробластов.

Таким образом можно заключить, что применение рекомбинантного белка TGF-β3, а также лентивирусного вектора, несущего кодирующую последовательность гена *Sox9*, позволяет добиться повышения экспрессии генов, ассоциированных с хондрогенезом, в дермальных фибробластах человека. Потенциально данные методы могут в дальнейшем использоваться при тканевой инженерии гиалинового хряща.

Литература

1. March L., Smith E. U., Hoy D. G. et al. Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders // Best Practice and Research. Clinical Rheumatology. 2014. Vol. 28 (3). P. 353–366.
2. Musumeci G., Aiello F. C., Szychlinska M. A. et al. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression // International Journal of Molecular Sciences. 2015. Vol. 16 (3). P. 6093–6112.
3. Zelinka A., Roelofs A. J., Kandel R. A. et al. Cellular therapy and tissue engineering for cartilage repair // Osteoarthritis and Cartilage. 2022. Vol. 30 (12). P. 1547–1560.
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. Vol. 8 (4). P. 315–317.
5. Зорина А. И., Зорин В. Л., Черкасов В. Р. Клеточные технологии в эстетической медицине // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и медицинской косметологии. 2010. Т. 4 (11). С. 72–82.
6. Jo A., Denduluri S., Zhang B. et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases // Genes and Diseases. 2014. Vol. 1 (2). P. 149–161.
7. Morikawa M., Derynck R., Miyazono, K. TGF-β and the TGF-β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2016. Vol. 8 (5). P. a021873.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-102

**ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕКОМБИНАНТОЙ ТАQ-ПОЛИМЕРАЗЫ
В СИСТЕМЕ *ESCHERICHIA COLI*****PRODUCTION OF MUTANT FORMS OF RECOMBINANT TAQ POLYMERASE
IN THE *ESCHERICHIA COLI***Р. Д. Маслов¹, Д. В. Балабова¹, П. В. Колосов¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}¹Алтайский государственный университет, Барнаул²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. КольцовоR. D. Maslov¹, D. V. Balabova¹, P. V. Kolosov¹, D. N. Scherbakov^{1,2}¹Altai State University, Barnaul²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ maslov.roman.00@mail.ru

Аннотация

Taq-полимераза — термостабильный фермент, впервые полученный из бактерии *Thermus aquaticus* и активно используемый при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Каждый из трех полученных в ходе работы вариантов продуцента содержал экспрессионную плазмиду с геном мутантной Taq-полимеразы. Определены оптимальные условия индукции ферментов. Получены три варианта мутантных Taq-полимераз, проведена их очистка, и проверена активность.

Abstract

Taq polymerase is a thermostable enzyme first obtained from the bacterium *Thermus aquaticus* and actively used in the polymerase chain reaction (PCR). Each of the three progenitor variants obtained in this work contained an expression plasmid with a mutant Taq polymerase gene. The optimal conditions for enzyme induction were determined. Three mutant Taq polymerase variants were obtained, purified, and tested for activity.

Мутации подразумевают какое-либо изменение в нуклеотидной последовательности гена. Замены, затрагивающие нуклеотидный состав кодонов, могут приводить к изменению аминокислотной последовательности белка, что может отразиться и на его свойствах. В ходе работы были выбраны мутации, способные оказать влияние на свойства получаемого фермента: вариант Taq22 имел замены E626K, I707L и E708Q; TaqRR — E742R; TaqKR — A743K. Все три варианта мутантных форм фермента обеспечивают увеличение скорости ПЦР, кроме того, вариант Taq22 дополнительно обладает устойчивостью к таким ингибиторам ПЦР, как компоненты крови, концентрация соли и присутствие SYBR Green [1, 2].

В работе были получены плазмидные векторы pET21-Taq22, pET21-TaqRR и pET21-TaqKR, обеспечивающие экспрессию мутантных форм гена Taq-полимеразы, после трансформации *Escherichia coli* штамм SHuffle® Express. Культивирование продуцентов проводили с использованием питательной среды LB до достижения суспензией клеток оптической плотности 0,6–0,8, измеренной при 600 нм. Индукцию проводили добавлением изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 ммоль/л. Для достижения оптимальных условий индукции время культивирования увеличивали до 20 ч, в то время как температуру снижали до 16 °С. Полученную биомассу клеток анализировали на наличие в ней целевого фермента методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле. После подтверждения на электрофореграмме наличия всех трех мутантных форм Taq-полимеразы в биомассе клеток была определена локализация фермента — периплазматическое пространство. Перед хроматографической очисткой проводили диализ полученных препаратов против 30 мМ раствора дигидрофосфата натрия при pH 7,4.

Мутантные формы Taq-полимеразы имели в своей аминокислотной последовательности 6 × His, поэтому последующую очистку ферментов проводили стандартным методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-сефарозе. После анализа хроматограмм всех трех вариантов фермента было установлено, что целевой белок элюируется преимущественно во второй фракции. Для удаления хлорида натрия из раствора проводили диализ против дигидрофосфата натрия при pH 7,9.

Проверку активности ферментов производили методом ПЦР в режиме реального времени. Для сравнения активности использовали эталонный коммерческий вариант Taq-полимеразы («БелБиоЛаб», Россия). В ка-

честве матрицы использовали плазмидную ДНК, включающую ген поверхностного белка вируса папилломы человека восемнадцатого типа (HPV18). Исходя из графиков амплификации, полученных в ходе ПЦР в режиме реального времени, было установлено, что активность проявил лишь один из трех вариантов полученных ферментов — TaqRR.

Полученные три мутантные формы Taq-полимеразы в перспективе могут заменить стандартный вариант фермента, однако для этого планируется изменить протокол очистки и оптимизировать состав реакционного буфера.

Литература

1. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. P. e40.
2. Yamagami T., Ishino S., Kawarabayasi Y., Ishino Y. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering // *Front. Microbiol.* 2014. Vol. 5. P. 1–10.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-103

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВЕКТОР PBSU ОБЕСПЕЧИВАЕТ ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ
ФОСФОЛИПАЗЫ С *B. THURINGIENSIS* В КЛЕТКАХ *B. MOJAVENSIS* *****RECOMBINANT VECTOR PBSU PROVIDES A HIGH LEVEL OF EXPRESSION
OF *B. THURINGIENSIS* PHOSPHOLIPASE C IN *B. MOJAVENSIS* CELLS**Ю. А. Меркульева², Е. А. Колосова^{1,2}, Д. Н. Щербаков^{1,2}¹Алтайский государственный университет, Барнаул²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. КольцовоYu. A. Merkuleva², E. A. Kolosova^{1,2}, D. N. Shcherbakov^{1,2}¹Altai State University, Barnaul²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ dnshcherbakov@gmail.com

Аннотация

Разработана рекомбинантная плазмида pBSU-PLC, содержащая ген фосфолипазы С *B. thuringiensis*. Экспрессия целевых генов в этом векторе находится под контролем сильного синтетического промотора Pgrac. Полученной рекомбинантной плазмидой были трансформированы клетки *B. mojavensis*. Полученный рекомбинантный штамм был использован для проведения опытной наработки рекомбинантной фосфолипазы С *B. thuringiensis* в опытно-промышленном цикле культивирования. В результате ферментационного цикла при последовательном пересеве из 15-литрового ферментера в 250-литровый через 13 ч культивирования был получен фермент, обладающий высокой активностью.

Abstract

A recombinant plasmid pBSU-PLC containing the *B. thuringiensis* phospholipase C gene has been developed. Expression of the target genes in this vector is under the control of the strong synthetic Pgrac promoter. *B. mojavensis* cells were transformed with the resulting recombinant plasmid. The obtained recombinant strain was used for experimental production of recombinant *B. thuringiensis* phospholipase C in the pilot cycle of cultivation. As a result of the fermentation cycle, with successive transfer from a 15-liter fermenter to a 250-liter one, an enzyme was obtained with high activity after 13 hours of cultivation.

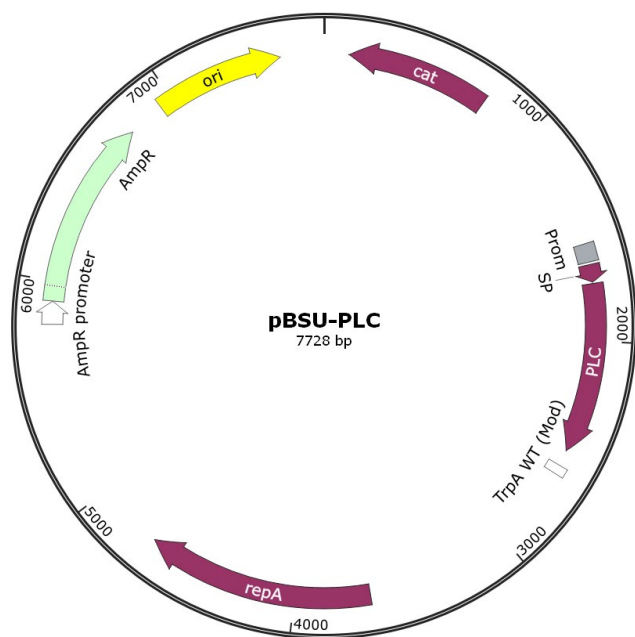
Фосфолипаза С (PLC) представляет собой фосфодиэстеразу, расщепляющую фосфолипиды с высвобождением диацилглицерина и фосфорилированной головной группы [1]. PLC были обнаружены у широкого круга организмов и необходимы для их роста, развития и вирулентности [2]. PLC в живых системах делятся на инозитол-специфические (PI-PLC), способные расщеплять только фосфатидинозитол-4,5-бисфосфат, и фосфатидилхолин-специфические (PC-PLC), расщепляющие преимущественно фосфатидилхолин, но способные гидролизовать и другие фосфолипиды [3]. Бактериальные фосфолипазы применяются в промышленности для рафинирования растительных масел и повышения выхода сыра, кроме того, рассматривается применение фермента в производстве биодизеля [4–7].

Фосфолипазы С из бактерий рода *Bacillus* являются привлекательным ферментом для разработки препаратов, используемых в рафинировании масел в промышленных масштабах, так как не проявляют гемолитической активности, обладают наиболее подходящим спектром субстратной специфичности, характеризуются термостабильностью, высокой удельной активностью и безопасностью [8].

Фосфолипазы С *B. thuringiensis* представляют собой секреторный белок, который синтезируется в виде длинного препрофермента из 283 аминокислот (а. о.), из которого 24 первых аминокислотных остатка — последовательность пре-пептида, а следующие 14 аминокислотных остатка — про-пептид. Зрелый фермент после отщепления пре-про-пептида включает 245 а. о. [9]. Несмотря на то, что фосфолипазы С из *B. cereus* и *B. anthracis* уже показали эффективность при использовании в промышленности, создание продуцентов, обеспечивающих повышенный выход подобных ферментов, является актуальной задачей. Целью данной работы была разработка рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез и секрецию фосфолипазы С *B. thuringiensis* в клетках *B. mojavensis*.

* Работа выполнена при поддержке гранта Управления Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям.

На первом этапе была получена плазмиды рBSU-PLC (см. рисунок). Для ее получения был использован ранее полученный вектор рНТЕ-РС-PLC, содержащий сильный синтетический промотор P_{grac} [10], из которого был удален ген, кодирующий белок-репрессор LacI. Для этого вектор рНТЕ-РС-PLC обрабатывали эндонуклеазами BstNI и EaqI («СибЭнзим», Новосибирск). После обработки эндонуклеазами рестрикции полученную ДНК очищали при помощи разделения в 1%-м геле агарозы. Бенд, соответствующий целевому продукту вектору рНТ255 без последовательности гена белка репрессора (общая длина 8332 п. н.), вырезали и очищали при помощи набора для выделения продуктов ПЦР из реакционных смесей (Евроген, Москва). Затем проводили реакцию лигирования. Продуктами лигационной реакции трансформировали клетки *E. coli* штамма NebStable. Отбор клонов проводили при помощи ПЦР с колоний. Структуру подтверждали при помощи секвенирования по Сенгеру.



Генетическая карта рекомбинантной плазмиды рBSU-PLC

Динамика фосфолипазной активности образцов культуральной жидкости

	Время культивирования в 250 л ферментере, ч					
	4	7	13	14	15	24
Активность, ед. акт/мл	167	170	250	150	139	141

Литература

1. El-Sayed M. Y., Roberts M. F. Charged detergents enhance the activity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) towards micellar short-chain phosphatidylcholine // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzym.* 1985. Vol. 831 (1). P. 133–141.
2. Barman A., Gohain D., Bora U., Tamuli R. // *Microbiol. Research.* 2018. Vol. 209. P. 55–69.
3. Martin S. F., Hergenrother P. J. // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37 (16). P. 5755–5760.
4. Mounts T. L., Nash A. M. // *Journal of Am. Oil Chem. Soc.* 1990. Vol. 67 (11). P. 757–760.
5. Maria L. De, Vind J., Oxenbøll K. M. et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2007. Vol. 74 (2). P. 290–300.
6. Cesarini S., Haller R. F., Diaz P., Nielsen P. M. // *Biotechnol. Biofuels.* 2014. Vol. 7 (1).
7. Casado V., Martín D., Torres C., Reglero G. *Enzymes in Food and Beverage Processing // Lipases and Phospholipases.* 2012. Vol. 861. P. 495–523.
8. Borrelli G. M., Trono D. // *Int. Journal of Mol. Sciences.* 2015. Vol. 16 (9). P. 20774–20840.
9. Hough E., Hansen L. K., Birknes B. et al. // *Nature.* 1989. Vol. 338 (6213). P. 357–360.
10. Merkuleva I. A., Shcherbakov D. N., Andreeva I. S., Bondar A. A. Screening of *Bacillus thuringiensis* natural isolates to find promising variants of phosphatidylcholine-specific phospholipase C // *AIP Conference Proceedings.* 2022. Vol. 2390, № 1.
11. Kurioka S., Matsuda M. Phospholipase C assay using p-Nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 75, № 1. P. 281–289.

Полученной рекомбинантной плазмидой рBSU-PLC была проведена трансформация клеток *B. mojavensis* штамма BDV-1. Затем с использованием полученного штамма продуцента была проведена опытная наработка фермента. Культивирование инокулята производилось в 15-литровом биореакторе (ООО «Сторге», Россия), основная ферментация — в 250-литровом ферментере (ООО «Сторге», Россия). В качестве инокуляционной и основной ферментационной была использована среда следующего состава (г/л): меласса — 25, кукурузный экстракт — 12,5, дрожжевой экстракт — 1, пептон — 0,5, MgSO₄ — 0,25, MnSO₄ — 0,03, CoCl₂ — 0,046, CaCl₂ — 1, софэксил — 0,5, вода водопроводная — до 1 л, pH = 6,8–7,0. Продолжительность и температура культивирования — 24 ч при 37 °С. Объем инокулята составлял 10 л (доза посевного материала 10 %), объем загружаемой питательной среды в биореактор емкостью 250 л составлял 100 л. Во время ферментации отбирали пробы для анализа активности фермента, которую определяли спектрофотометрическим методом с использованием синтетического субстрата в пересчете на 1 мл ферментного препарата [11] (см. таблицу).

Результаты глубинного культивирования в условиях опытно-промышленного биореактора (250 л) показали, что полученный рекомбинантного штамма-продуцента *B. mojavensis* обеспечивает накопление фосфолипазы С *B. thuringiensis* на высоком уровне. Для получения ферментного препарата с высокой активностью достаточно 13 ч, а дальнейшее увеличение продолжительности культивирования не приводит к росту активности.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-104

ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ,
СОСТАВЛЯЮЩИХ ОСНОВУ БИОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ
«CODE OF BALANCE F1», ПОТЕНЦИАЛЬНО СПОСОБНЫХ
К ЭФФЕКТИВНОМУ РАЗЛОЖЕНИЮ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

STUDY OF THE CELLULASE ACTIVITY OF BACTERIAL STRAINS,
UNDERLYING THE BIOLOGICAL PLANT PROTECTION PRODUCT “CODE OF BALANCE F1”,
WHICH ARE POTENTIALLY CAPABLE OF CELLULOSE DECOMPOSITION

К. В. Механцева¹, Н. Г. Васильченко^{1,2}, В. А. Чистяков¹

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

²Альметьевский государственный нефтяной институт

K. V. Mekhantseva¹, N. G. Vasilchenko^{1,2}, V. A. Chistyakov¹

¹Southern Federal University, Rostov-on-Don

²Almetyevsk State Oil Institute

✉ mekhantseva@sfedu.ru, wnikita37@gmail.com, vladimirchi@sfedu.ru

Аннотация

При разложении пожнивных остатков используются штаммы микроорганизмов, способные разлагать целлюлозу с помощью ферментов группы целлюлаз. В работе изучалась целлюлазная активность штаммов бактерий, выделенных из ризосферной зоны растений в Краснодарском крае: 8 штаммов рода *Bacillus* и 2 штамма рода *Paenibacillus*. Оказалось, что 4 штамма обладают высокой целлюлазной активностью и могут рассматриваться как возможные деструкторы пожнивных остатков.

Abstract

When decomposing stable residues, strains that are capable of decomposing cellulose with the help of enzymes from the cellulase group are used. Cellulase activity of bacterial strains isolated from the rhizosphere zone of plants in the Krasnodar Territory was assumed: 8 strains of the genus *Bacillus* and 2 strains of the genus *Paenibacillus*. It turned out that 4 strains have high cellulase activity and can be neglected as possible decomposers of crop residues.

Целлюлоза — сложный природный полимер, состоящий из остатков D-глюкозы. Природная целлюлоза включает прочные кристаллические участки и более аморфные участки, подверженные действию ферментов. Разложение целлюлозы в естественных условиях способно производить осуществляются бактерии, способные продуцировать во внеклеточную среду ферменты группы целлюлаз [1]. Процесс расщепления целлюлозы применяется в разных областях промышленности, в том числе при разложении пожнивных остатков, способствующем гумификации почвы [2]. Один из способов утилизации пожнивных остатков — использование микроорганизмов, разлагающих целлюлозу.

Для деструкции целлюлозы бактерии выделяют целлюлазы во внеклеточную среду. Аэробные спорообразующие бактерии обладают широким спектром целлюлаз. Так, данная группа ферментов была тщательно изучена у бактерий вида *Bacillus subtilis* [3], и уже длительное время известно о способности бактерий данного рода разлагать микрокристаллическую целлюлозу [4, 5]. Меньше данных представлено о целлюлозолитиках рода *Paenibacillus* и их целлюлазах.

Изученные в настоящей работе штаммы бактерий были выделены из почвенных образцов, которые были отобраны с глубины 0–10 см (ризосферная зона растений) в различных районах Краснодарского края [6]. Штаммы бактерий были отобраны по ряду критериев (высокий уровень антагонизма, отсутствие фитотоксических свойств и др. [7] и идентифицированы как представители бактерий рода *Paenibacillus* (8 штаммов: K1.14, O1.27, O2.11, R3.13, R4.5, R4.24, R5.31, R6.14) и бактерий рода *Bacillus* (2 штамма: V 3.14, R4.6).

Целью работы было изучение целлюлазной активности штаммов бактерий, составляющих основу биологического средства защиты растений Code of Balance F1 [7], потенциально способных к эффективному разложению целлюлозы.

Для количественной оценки и сравнения активности целлюлаз исследуемых штаммов микроорганизмов использовалась питательная среда следующего состава: вода дистиллированная — 1 л, KH_2PO_4 — 1,0 г;

NH_4NO_3 — 2,0 г; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г; NaCl — 0,5 г; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,01 г; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 г; CaCl_2 — 0,01 г; агар-агар — 30,0 г; микрокристаллическая целлюлоза — 8,0 г; дрожжевой экстракт — 0,1 г; pH — 7,0–7,2.

Биомасса суточных культур штаммов бактерий, полученных на картофельно-декстрозном агаре, переносилась методом укола бактериологической иглой на чашки Петри с целлюлозным агаром. В каждой чашке Петри помещалось по одному штамму в трех повторностях на равном удалении друг от друга. Инокулированные чашки инкубировались 72 ч при температуре 29 °С, затем заливались раствором Люголя в модификации Грама для выявления зон гидролиза целлюлозы.

Диаметр зон гидролиза (зон просветления, окрашенного раствором Люголя целлюлозного агара) измерялся штангенциркулем. Для оценки целлюлазной активности рассчитывались значения индекса лизиса по формуле:

$$I_{\text{лиз}} = \frac{R_{\text{лиз}}^2}{R_{\text{кол}}^2},$$

где $R_{\text{лиз}}$ — радиус зоны лизиса, $R_{\text{кол}}$ — радиус колонии [8].

Полученные данные по радиусу зон лизиса и по индексам лизиса представлены в таблице.

Целлюлазная активность изученных штаммов бактерий

Вид	Название штамма	Радиус зоны лизиса, мм	Индекс лизиса
<i>P. jamilae</i>	K1.14	12,2 ± 0,33	108,8
<i>P. peoriae</i>	O1.27	11,0 ± 0,07	88,9
<i>P. peoriae</i>	O2.11	9,0 ± 0,07	81,0
<i>P. peoriae</i>	R3.13	12,0 ± 1,13	144,0
<i>P. peoriae</i>	R4.5	8,7 ± 0,65	48,1
<i>P. jamilae</i>	R4.24	13,5 ± 0,98	133,9
<i>P. polymyxa</i>	R5.31	11,7 ± 0,65	136,1
<i>P. peoriae</i>	R6.14	7,8 ± 0,88	45,1
<i>B. amyloliquefaciens</i>	V3.14	10,0 ± 1,13	73,5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	R4.6	10,8 ± 0,33	117,4

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод, что наиболее высокие показатели активности целлюлаз были отмечены для штаммов: K1.14, R3.13, R4.24, V3.14. Наиболее низкую активность среди протестированных штаммов продемонстрировали O2.11, R4.5, R6.14. Различий в целлюлазной активности между представителями бактерий различных родов выявлено не было, и наиболее вероятно, что целлюлазная активность зависит от спектра продуцируемых целлюлаз. Для большей части штаммов характерны достаточно высокие показатели целлюлазной активности.

В дальнейшем планируется проведение количественной оценки расщепляемой целлюлозы. При этом штаммы K1.14, R3.13, R4.24, V 3.14 потенциально могут быть использованы как деструкторы пожнивных остатков.

Литература

- Lakhundi S., Siddiqui R., Khan N.A. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections // Parasites Vectors. 2015. Vol. 8 (1). P. 1–16.
- Четверикова Д. В., Бакаева М. Д., Логинов О. Н. Новые ассоциации целлюлозолитических микроорганизмов для разложения пожнивных остатков // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019. № 2. С. 73–79. DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-2-73-79.
- Deka D. et al. Enhancement of cellulase activity from a new strain of Bacillus subtilis by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates // Enzyme research. 2011. Vol. 2011.
- Kim C. H. Characterization and substrate specificity of an endo-beta-1, 4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of Bacillus circulans // Applied and Environmental Microbiology. 1995. Vol. 61, № 3. P. 959–965.
- Aa K. et al. Characterization of production and enzyme properties of an endo-β-1, 4-glucanase from Bacillus subtilis CK-2 isolated from compost soil // Antonie Van Leeuwenhoek. 1994. Vol. 66. P. 319–326.
- Gorovtsov A. V., Vasilchenko N. G., Prazdnova E. V. et al. The influence of soil type and preceding crop on the suppression of fusarium by indigenous spore-forming bacteria // Periodico Tche Quimica. 2019. Vol. 16, № 33. P. 225–240.
- Патент № 2724464. Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A01N 63/00, A01P 3/00. Штаммы, биопрепарат, способ получения биопрепарата и способ биологической защиты сельскохозяйственных культур от фузариоза: № 2019139147: заявл. 02.12.2019; опублик. 23.06.2020 / В. А. Чистяков, А. В. Горовцов, А. В. Усатов и др.; заявитель Общество с ограниченной ответственностью Агрофирма «Урожайная».
- Никитина З. К. и др. Сравнительная оценка роста дейтеромицетов при использовании различных белоксодержащих субстратов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 11. С. 27–32.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-105

ПРОЕКТИРОВАНИЕ НУТРИЕНТНОГО СОСТАВА БИОМАССЫ НАЗЕМНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ * PRINCIPLES OF TERRESTRIAL INVERTEBRATES BIOMASS NUTRIENT COMPOSITION DESIGN

М. Д. Морозова, С. Э. Чернышев, Р. Т-о. Багиров, И. Б. Бабкина, В. П. Модяева,
К. Е. Скрипцова, Е. Ю. Субботина, М. В. Щербаков, А. В. Симакова

Томский государственный университет

M. D. Morozova, S. E. Tshernyshev, R. T-o. Baghirov, I. B. Babkina, V. P. Modyaeva,
K. E. Skriptcova, E. Yu. Subbotina, M. V. Shcherbakov, A. V. Simakova

Tomsk State University

✉ science.margarita145@list.ru

Аннотация

Получение биомассы беспозвоночных с заданными параметрами нутриентного состава позволит получать насыщенный пищевой продукт с заданным составом питательных веществ. Исследовалось изменение содержания отдельных нутриентов в биомассе модельных видов беспозвоночных: гигантской ахатины *Lissachatina fulica* (Férussac, 1821) и мраморного таракана *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789), через увеличение концентрации исходных веществ в кормовом субстрате. Минимальное увеличение содержания витаминов С и В7 не оказало влияния на увеличение белка в биомассе, его содержание несколько уменьшилось: с 20,4 % до 18,8 % у ахатин и с 8,6 до 8,0 % у тараканов. Зафиксировано заметное увеличение содержания витаминов В1, В2, В3, В4 и В9 у ахатин; В1, В4 и В9 у тараканов. Жирорастворимые витамины показали значительное увеличение содержания в биомассе у тараканов и ахатин, за исключением витамина К, снизившегося у ахатин. Зафиксировано увеличение минералов: Se, I, Pb, Hg, Mo, Ca, Na, K, Cl у ахатин, Fe, Se, Zn, Mn, Mg, P, Ca, Na, K, Cl у тараканов. Установлено, что обогащение пищевого субстрата исходными веществами приводит к изменению их содержания в биомассе беспозвоночных.

Abstract

The method of providing an invertebrate biomass with particular parameters of a nutrient composition to produce biomass supplied with relatively more nutrients is discussed. An increase in the content of particular nutrients in the biomass of model species Giant African land snail *Lissachatina fulica* (Férussac, 1821) and the Speckled cockroach *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789) was studied via the input of precursor material in the food substrate. A minimal input of vitamins C and B7 to the food substrate resulted in only a slight decrease in the level of protein in biomass of snails from c. 20.4 % to 18.8 % and in cockroaches from c. 8.6 to 8.0 %, but an increase in vitamins B1, B2, B3, B4 and B9 was found in the biomass of snails, and B1, B4 and B9 in cockroaches; the content of liposoluble vitamins A, E, D and K increased significantly in the biomass of cockroaches, but A, E and D increased and K decreased in snails. The content of Se, I, Pb, Hg, Mo, Ca, Na, K and Cl in the biomass of snails and of Fe, Se, Zn, Mn, Mg, P, Ca, Na, K and Cl in cockroaches also increased. It is shown, that food substrate enrichment by precursor material results in nutrient composition changes in the invertebrate biomass.

Биомасса беспозвоночных содержит большое количество необходимых для питания нутриентов, а белок животного происхождения обеспечивает поступление в организм всех 11 незаменимых аминокислот для человека (валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин). По соотношению содержания нутриентов и калорийности биомасса беспозвоночных безусловно относится к насыщенному пищевому продукту [1]. Так, калорийность исследованных видов не превышает 100 ккал, тогда как содержание макронутриентов у ахатин и тараканов составило: белка — 20,4 % и 8,6 %, жира — 1,43 % и 3,7 %, углеводов — 0,28 % и 13,6 % соответственно, при высоком разнообразии минералов и витаминов. При этом у беспозвоночных отмечено низкое или неравномерное содержание некоторых витаминов (В1, В3, В7, С, D, К), ряда минералов и жирных кислот [3–6, 8]. Данные по содержанию отдельных нутриентов различаются и от региона содержания беспозвоночных, например, в выращенных в Африке тараканах и личинках *Scarabeoidea* выше значения белка, зольности, некоторых других элементов [2]. Очевидно, что состав нутриентов в биомассе беспозвоночных не постоянен и, вероятно, зависит от ряда факторов их содержания. Наше исследование посвящено выявлению влияния веществ-прекурсоров нутриентов, вносимых дополнительно в питательный субстрат, на накопление соответствующих питательных веществ в биомассе модельных видов беспозвоночных.

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-26-00075.

© М. Д. Морозова, С. Э. Чернышев, И. Б. Бабкина, Р. Т-о. Багиров, В. П. Модяева, К. Е. Скрипцова, Е. Ю. Субботина, М. В. Щербаков, А. В. Симакова, 2023

Эксперимент проводился в пяти группах у каждого вида (ахатин и тараканов), содержащихся в одних и тех же условиях. Первая группа — контрольная, в ней беспозвоночных выращивались на пищевом субстрате без внесения предшественников нутриентов. Вторая группа получала в пищевой субстрат витамины С и В7, третья группа потребляла субстрат с минеральной комплексной добавкой, четвертая — с дополнительными витаминами В1 (тиамин), В9 (фолаты), В3 (ниацин), пятая — жирорастворимые витамины А, D, Е, К. После 30 дней выращивания на средах беспозвоночные были зафиксированы замораживанием и переданы в сертифицированную лабораторию ООО «Сибтест» на анализы.

Результаты в сравнении с контрольными группами показали заметное изменение в количественном составе нутриентов в биомассе подопытных беспозвоночных, как в сторону уменьшения отдельных элементов, так и увеличения.

Так, минимальное внесение в пищевой субстрат витаминов С и В7 не оказало влияния на увеличение белка в биомассе, его содержание несколько уменьшилось: с 20,4 % до 18,8 % у ахатин и с 8,6 до 8,0 % у тараканов. Зафиксировано увеличение минералов: Se, I, Pb, Hg, Mo, Ca, Na, K, Cl у ахатин, Fe, Se, Zn, Mn, Mg, P, Ca, Na, K, Cl у тараканов, снижение Zn, Mn, Mg, P у ахатин и Pb, Mo, I у тараканов.

Произошло заметное увеличение содержания витаминов В1, В2, В3, В4 и В9 у ахатин, В1, В4 и В9 у тараканов, при этом у ахатин резко упало значение В6, а у тараканов заметно некоторое падение значений В2, В3 и В6.

Содержание жирорастворимых витаминов значительно увеличилось в биомассе у тараканов и ахатин, за исключением витамина К, снизившегося у ахатин. В целом обогащение пищевого субстрата исходными веществами привело к заметному изменению содержания нутриентов в биомассе беспозвоночных. На следующем этапе экспериментов концентрация прекурсоров, вносимых в субстрат, будет увеличена вдвое, что позволит, вероятно, получить более отчетливый результат.

Более подробное изложение идеи, постановки и результатов эксперимента будет представлено в готовящейся статье.

Литература

1. Drownowski A., Fulgoni III V.L. Nutrient density: principles and evaluation tools // *The American journal of clinical nutrition*. 2014. Vol. 99 (5). P. 1223S–1228S.
2. Hlongwane Z. T., Slotow R., Munyai T. C. Nutritional composition of edible insects consumed in Africa: A systematic review // *Nutrients*. 2020. Vol. 12 (9). P. 2786.
3. Oonincx D., Finke M. D. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition // *Journal of Insects as Food and Feed*. 2021. Vol. 7 (5). P. 639–659.
4. Shah A. A. et al. Nutritional composition of various insects and potential uses as alternative protein sources in animal diets // *Animal Bioscience*. 2022. Vol. 35 (2). P. 317.
5. Van Huis A. et al. Edible insects: future prospects for food and feed security // *Food and agriculture organization of the United Nations*. 2013. Vol. 171.
6. Van Huis A. Potential of insects as food and feed in assuring food security // *Annual review of entomology*. 2013. Vol. 58. P. 563–583.
7. Tshernyshev S. E. et al. Invertebrates of Siberia, a potential source of animal protein for innovative food production. 1. The keelback slugs (*Gastropoda: Limacidae*) // *Acta Biologica Sibirica*. 2022. Vol. 8. P. 749–762.
8. Zielińska E. et al. Selected species of edible insects as a source of nutrient composition // *Food Research International*. 2015. Vol. 77. P. 460–466.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-106

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ AMUC_1100 И P9
И ОЦЕНКА ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*****PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS AMUC_1100 AND P9
AND ASSESSMENT OF THEIR *IN VITRO* ANTITUMOR ACTIVITY**

М. В. Неклесова, Н. Диб

Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

M. V. Neklesova, N. Deeb

SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

✉ neklesova.m@mail.ru

Аннотация

Пробиотические свойства *Akkermansia muciniphila* в терапии метаболических, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний опосредованы поверхностным белком Amuc_1100 (Amuc) и секретлируемым белком P9, однако их совместное действие не исследовано. В ходе данной работы был получен рекомбинантный продуцент *E. coli* BL21(DE3) белков Amuc и P9. Планируется провести эксперименты на клеточной линии колоректального рака с использованием комбинации Amuc и P9.

Abstract

The probiotic properties of *Akkermansia muciniphila* in the treatment of metabolic, cardiovascular and oncological diseases are mediated by the surface protein Amuc_1100 (Amuc) and secreted protein P9, but their combined effect has not been investigated. In this work, a recombinant producer *E. coli* BL21(DE3) of proteins Amuc and P9 was obtained. It is planned to conduct experiments on the colorectal cancer cell line using a combination of Amuc and P9.

Akkermansia muciniphila (*A. muciniphila*) — грамотрицательная анаэробная муцин-деградирующая бактерия, являющаяся одним из наиболее распространенных представителей кишечной микробиоты человека. Данную бактерию называют полезным микробом следующего поколения, поскольку *A. muciniphila* благотворно влияет на лечение ожирения, диабета и сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, показана ее роль в терапии злокачественных новообразований.

Например, повышенное количество *A. muciniphila* наблюдалось у пациентов с немелкоклеточным раком легких, гепатоцеллюлярной и почечно-клеточной карциномой, которые реагировали на лечение ингибиторами иммунных контрольных точек, в то время как у пациентов с прогрессирующим заболеванием наблюдался низкий уровень данной бактерии [1]. Также совмещение иммунотерапии IL-2 и приема *A. muciniphila* усиливало противоопухолевые эффекты у мышей с подкожной меланомой и колоректальной опухолью [2].

Эффект *A. muciniphila*, вероятно, опосредован секретлируемыми веществами (например белок P9) или компонентами внешней мембраны (белок Amuc), поскольку они потенциально могут достигать эпителиального барьера и взаимодействовать с ним [1]. Показано, что Amuc участвует во взаимодействии бактерии с хозяином посредством активации Toll-подобного рецептора 2 и способствует реализации полезных свойств *A. muciniphila* в отношении ожирения, резистентности к инсулину и восстановления целостности кишечного барьера [3]. В другом эксперименте на мышках белок P9 вызывал значительную потерю веса, снижение потребления пищи, улучшение толерантности к глюкозе, регулируя секрецию GLP-1 и IL-6, а также индуцируя термогенез бурой жировой ткани [4].

Данная работа направлена на получение и *in vitro* исследование противоопухолевой активности комбинации белков Amuc и P9. Была проведена последовательная сборка генетических конструкций, содержащих гены Amuc, P9 и плазмидные векторы рJET2.1, рET15b: фрагменты генов Amuc и P9 были получены из ДНК *A. muciniphila* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были использованы следующие последовательности праймеров:

Amuc (F: GGGTACCATATGATCGTCAATCCAAACGC,

R: CCTTGGCTCGAGATCTTCAGACGGTTCCTG),

P9 (F: AAGGAGATATACATATGAACATGCACTCATTCCGTTG,

R: GGTGGTGGTCTCGAGTTTTCCGGAGGATCCAGC).

Выделенные жирным шрифтом последовательности являются сайтами рестрикции для ферментов NdeI и XhoI соответственно.

Ампликоны из ПЦР-смеси очищали и лигировали с плазмидой pJET1.2. После этого *E. coli* XL1-Blue трансформировали с использованием конструкций pJET-Amuc и pJET-P9. Наличие вставки в бактериальных клонках проверяли с помощью ПЦР. *E. coli* культивировали в среде LB с добавлением ампициллина и выделяли плазмидную ДНК. Затем проводили рестрикцию плазмид pET15b, pJET-Amuc, pJET-P9 (NdeI и XhoI) и использовали 1%-й агарозный гель для разделения рестрикционных фрагментов. Фрагменты ДНК выделяли из геля, pET15b лигировали с генами Amuc и P9. Полученные плазмиды (pET15b-Amuc и pET15b-P9) трансформировали в *E. coli* XL1-Blue. С помощью ПЦР проводили скрининг бактериальных клонов на наличие вставки, после чего клетки бактерий культивировали в среде LB с добавлением ампициллина для наработки плазмид. Затем из клеток *E. coli* XL1-Blue была выделена плазмидная ДНК. Полученные конструкции pET15b-Amuc и pET15b-P9 использовались для трансформации *E. coli* BL21 (DE3).

Следующий шаг — получение и очистка белков Amuc и P9 и их тестирование на клеточной линии СТ26 (аденокарцинома толстой кишки мыши). Будут исследованы жизнеспособность, апоптоз, аутофагия и секреция опухолевыми клетками цитокинов. Подтверждение эффективности Amuc и P9 может стать основой для применения данных белков в качестве новых пищевых или фармацевтических добавок для больных колоректальным раком.

Литература

1. Segers A., de Vos W. M. Mode of action of *Akkermansia muciniphila* in the intestinal dialogue: role of extracellular proteins, metabolites and cell envelope components. 2023.
2. Shi L. et al. Combining IL-2-based immunotherapy with commensal probiotics produces enhanced antitumor immune response and tumor clearance // *Journal for immunotherapy of cancer*. 2020. Vol. 8, № 2.
3. Plovier H. et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice // *Nat. Med. Nature Publishing Group*. 2017. Vol. 23, № 1. P. 107–113.
4. Yoon H. S. et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice // *Nat. Microbiol. Nature Research*. 2021. Vol. 6, № 5. P. 563–573.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-107

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ПРООКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ФОРМУЛИРОВКИ МЕНАДИОНА НА ОСНОВЕ ТВЕРДЫХ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ***CYTOTOXIC AND PROOXIDANT EFFECTS OF AN ANTITUMOR FORMULATION OF MENADIONE BASED ON SOLID LIPID NANOPARTICLES**В. А. Николаева¹, М. Зухайб¹, М. И. Камалов¹, Ф. М. Нахметова¹,
М. В. Хохлачев¹, Т. Н. Паширова², Т. И. Абдуллин¹, Д. В. Салахиева¹¹Казанский федеральный университет²Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова, КазаньV.A. Nikolaeva¹, M. Zoughaib¹, M. I. Kamalov¹, F.M. Nakhmetova¹, M. V. Khokhlachev¹,
T. N. Pashirova², T. I. Abdullin¹, D. V. Salakhieva¹¹Kazan Federal University²Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan

✉ nikolviktoriiia@gmail.com

Аннотация

Получены твердые липидные наночастицы (ТЛН), содержащие инкапсулированный менадион и модифицированные пептидом L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (RGD). Изучены коллоидные характеристики формулировок и оценено их влияние на жизнеспособность и окислительный статус опухолевых клеток.

Abstract

Solid lipid nanoparticles (SLN) containing encapsulated menadione and modified with L-arginyl-glycyl-L-aspartic acid (RGD) peptide were obtained. The colloidal characteristics of the formulations were studied and their influence on the viability and oxidative status of tumor cells was assessed.

Опухолевые клетки вследствие особенностей метаболизма обладают повышенной чувствительностью к редокс-активным соединениям, включая прооксиданты, что представляет интерес для редокс-направленной химиотерапии. Перспективным химиотерапевтическим агентом является менадион, способный индуцировать окислительный стресс посредством прямой генерации активных форм кислорода (АФК) и других механизмов. Однако фармакологическое применение менадиона *per se* ограничено его пониженной растворимостью в воде и селективностью действия. Актуальным подходом является комбинирование менадиона с таргетированными липидными переносчиками, среди которых особый интерес представляют ТЛН, поскольку они имеют повышенную стабильность и инкапсулирующую способность по сравнению с липосомами.

Цели данной работы — создание противоопухолевой формулировки менадиона на основе ТЛН, модифицированных пептидом RGD, и оценка ее влияния на опухолевые клетки.

ТЛН на основе глицерилстеарата (Precirol® АТО 5, Gattefossé) получали в растворе Poloxamer 188 методом ультразвуковой гомогенизации. По данным динамического рассеяния света, исходные ТЛН представляли собой наноразмерные однородные системы (гидродинамический диаметр ≈ 110 нм, PDI $\approx 0,2$) с анионным зарядом ($\zeta \approx -24$ мВ); поверхностная иммобилизация амфифильного пептида RGD и включение менадиона незначительно модулировали коллоидные характеристики.

Установлено, что формулированный менадион обладает большей цитотоксичностью по сравнению со свободным соединением на клетках аденокарциномы предстательной железы PC-3. При этом наименьшие значения IC₅₀ продемонстрировала таргетированная формулировка с пептидом RGD, что объясняется их усиленным клеточным поглощением вследствие специфичности пептида RGD к интегринным рецепторам, сверхэкспрессирующимся на опухолевых клетках. По данным флуоресценции DCFDA инкапсулированный в ТЛН–RGD менадион вызывал значительное повышение уровня АФК в клетках на фоне истощения уровня восстановленного глутатиона, что обусловлено усиленным прооксидантным эффектом полученной формулировки.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения противоопухолевой активности формулировок менадиона в составе ТЛН, таргетированных опухоль-специфическими пептидами, и могут быть использованы для создания других формулировок на основе ТЛН для химиотерапии.

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект № 20-73-10105), <https://rscf.ru/en/project/20-73-10105/>.

© В. А. Николаева, М. Зухайб, М. И. Камалов, Ф. М. Нахметова, М. В. Хохлачев, Т. Н. Паширова, Т. И. Абдуллин, Д. В. Салахиева, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-108

**БИОТЕХНОЛОГИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ
ШИРОКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДА ЛЕВАНА****BIOTECHNOLOGY OF MULTI-PURPOSE COMPOSITE MATERIALS
BASED ON LEVAN POLYSACCHARIDE**

Н. В. Новокупцев, В. В. Ревин

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск

N. V. Novokuptsev, V. V. Revin

Ogarev Mordovia State University, Saransk✉ nikolay.novokuptsev@yandex.ru**Аннотация**

Актуальным направлением биотехнологии на сегодняшний день является получение биополимера в виде микробного экзополисахарида левана в результате культивирования штамма-продуцента и получение биокomпозиционных материалов широкого назначения, соответствующих высоким современным требованиям: экологическим, физико-механическим, структурным и потребительским свойствам.

Abstract

The actual direction today is the production of a biopolymer in the form of microbial levan exopolysaccharide as a result of the cultivation of the producer strain and the production of multi-purpose biocomposite materials that meet high modern requirements, environmental, physico-mechanical, structural and consumer properties.

В настоящее время разрабатывается и производится множество различных композиционных материалов, обладающих хорошими эксплуатационными и потребительскими свойствами. Использование синтетических полимеров приводит к выделению в процессе эксплуатации в воздушную среду различных токсичных веществ. Поэтому проблема снижения токсичности и биоразлагаемости композиционных материалов весьма актуальна. Для ее решения используют различные способы, ведется интенсивный поиск новых природных соединений, способных заменить синтетические полимеры на биополимеры [1].

Перспективные биополимеры — полисахариды микробного происхождения, одним из которых является экзополисахарид леван [2]. Он обладает высокими адгезивными свойствами и может быть использован при получении биокomпозиционных материалов, например на основе растительного сырья, которые соответствуют современным требованиям стандартов: экологическим, эксплуатационным, физико-механическим и потребительским характеристикам [3, 4].

Изучено образование левана штаммом-продуцентом на дешевых питательных средах, содержащих меласу, а также исследованы возможности использования культуральной жидкости, содержащей леван в качестве биосвязующего при изготовлении прессованных биокomпозиционных материалов из отходов древесины. Накопление полисахарида при культивировании штамма-продуцента на отходах биотехнологических предприятий зависело от состава питательной среды. Показана возможность использования культуральной жидкости, содержащей леван, в качестве биологического связующего при получении биокomпозиционных материалов. Получены биокomпозиты на основе микробного левана, а также исследованы их физико-механические параметры и проанализирована их структура [3].

Для получения биоразлагаемого композиционного материала в виде пленки были использованы полисахарид леван, выделенный из полученных культуральных жидкостей штамма-продуцента, и регулирующие добавки, улучшающие физико-механические свойства полученных материалов, что дает возможность получить биоразлагаемые композиционные материалы в виде пленок для пищевой, фармакологической промышленности, а также медицины. Физико-механические свойства пленок оценивались по пределу прочности при растяжении и относительному удлинению.

В результате проведено культивирование штамма-продуцента левана на питательных средах, содержащих меласу в концентрациях 100–700 г/л. При этом накопление левана составило 10–40 г/л. Также проведена модификация левана для повышения его реакционной способности как адгезивного соединения. Получен биокomпо-

зиционный материал на основе лигноцеллюлозного сырья. При этом предел прочности при статическом изгибе составил 7–24 МПа в зависимости от состава биокомпозита и условий его получения. Водопоглощение — 17 %, разбухание по толщине — 10 %. В зависимости от состава и условий получения биоразлагаемых пленок прочность при растяжении составила 0,8–2,3 МПа, относительное удлинение — 14–32 %.

Ключевые преимуществами разработки являются: экологическая безопасность, биоразлагаемость и биосовместимость с окружающей средой, утилизация отходов промышленности, себестоимость ниже на 25–50 % по отношению к существующим аналогам. Можно сделать вывод, что полученные биокомпозиционные материалы могут найти широкое применение в различных отраслях промышленности, в частности, изготовлении мебели для детских и медицинских учреждений, а также биоразлагаемых пленок для медицины и косметологии.

Литература

1. Novokuptsev N. V., Kadimaliev D. A., Abd A. J. Production of an environmentally friendly, pressed composite material from straw using biological binders developed from modified residual beer yeast and spent microbial culture media containing the polysaccharide levan // *Journal of Materials and Environmental Science*. 2018. Vol. 9. P. 2539–2548.
2. Ревин В. В. и др. Биокомпозиционные материалы: монография. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2021. 332 с.
3. Revin V. V., Novokuptsev N. V., Redkin N. A. Optimization of cultivation conditions for *Azotobacter vinelandii* D-08, producer of the polysaccharide levan, for obtaining biocomposite materials // *Bioresources*. 2016. Vol. 11. P. 9661–9675.
4. Kadimaliev D., Revin V., Vodyakov V. Computation of durability of particle boards based on biobinders during thermal aging // *Journal of the Indian Academy of Wood Science*. 2021. Vol. 18. P. 26–31

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-109

**УСТАНОВЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
ИЗ *MYOXOCERPHALUS OCTODECEMSPINOSUS* МЕТОДАМИ
КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ***

**ESTABLISHMENT OF THE ICE-BINDING PROTEIN'S SECONDARY STRUCTURE
FROM *MYOXOCERPHALUS OCTODECEMSPINOSUS* BY THE CIRCULAR DICHROISM METHOD**

Г. А. Олейник, П. В. Жданова, С. В. Баранова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

G. A. Oleinik, P. V. Zhdanova, S. V. Baranova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ oleinik@niboch.nsc.ru

Аннотация

Организмы, обитающие в зоне пониженных температур, продуцируют лед-связывающие белки. Эти белки способны связываться с кристаллами льда и снижать повреждения клеток при замерзании. Для эффективного использования свойств таких белков в медицине и промышленности необходимо знать их структуру и механизм связывания со льдом. Данное исследование вносит вклад в изучение структурно-динамических механизмов действия лед-связывающих белков.

Abstract

Organisms living in the cold zone produce ice-binding proteins. These proteins are able to bind to ice crystals and reduce cell damage when the temperature drops. It is necessary to know the structure of such proteins and the mechanism of their binding to ice in order to effectively use the properties of IBPs in medicine and industry. This study contributes to the study of the structural and dynamic mechanisms of action of ice-binding proteins.

Люди давно задумывались о том, что позволяет организмам существовать в низкотемпературных условиях. В конце 1960-х гг. впервые были обнаружены антифризные гликопротеины в крови Антарктических нототенионидных рыб [1]. Это стало отправной точкой в изучении различных лед-связывающих белков (ИБР) и антифризных гликопротеинов. ИБР — это белки, которые обладают способностью связываться со льдом и влиять на его рост, способствуя снижению повреждений клеток.

Лед-связывающие белки имеют различные области применения: в пищевой промышленности при заморозке продуктов, сельском хозяйстве, здравоохранении, биотехнологии, а также в качестве криопротекторов в криоконсервации клеток, тканей и органов.

Свойства подобных белков имеют очевидную пользу, тем не менее механизмы связывания белка со льдом еще недостаточно изучены. Изучение структуры и механизмов действия этих белков позволит расширить и оптимизировать их производство для дальнейшего применения. Для большинства ИБР известны только теоретические модели, построенные по гомологии. Целью данной работы было подтверждение методом кругового дихроизма вторичной структуры одного из представителей лед-связывающих белков — P80961 (Uniprot), обнаруженного в сыворотке крови рыб вида *Myoxocephalus octodecemspinus* (длиннорогий бычок), а также описание его вторичной структуры в комплексе со льдом с помощью молекулярно-динамического моделирования.

В данной работе был получен рекомбинантный белок P80961. Для получения и выделения белка плазмиду, содержащую целевой ген, трансформировали в химически компетентные клетки BL21 *E. Coli* по стандартному протоколу [2]. Далее белок выделяли на хелатирующей колонке HisTrap HP (GE Healthcare, США) с последующей очисткой эксклюзионной хроматографией на колонке 26/600 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare, США). Методом кругового дихроизма (по результатам трех независимых экспериментов) была подтверждена вторичная структура ИБР. Она представлена в основном α -спиралями и неструктурированными элементами. Спектры кругового дихроизма получены в диапазоне температур 0,2–80 °С. Рекомбинантный белок P80961 стабилен при 40 °С, а при дальнейшем нагревании происходит его частичная денатурация с сохранением высокого процента α -спиралей.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-24-00256.

© Г. А. Олейник, П. В. Жданова, С. В. Баранова, 2023

Трёхмерная структура P80961 получена моделированием по гомологии с помощью веб-серверов AlphaFold и SWISS-MODEL. Далее молекулярную динамику проводили для IBP и его комплекса со льдом в условиях явной модели растворителя в течение 50 нс. В результате анализа полученных данных было показано образование водородных связей с поверхностью льда Thr, Asn, Asp, Gln и Glu в различных позициях, находящихся на расстоянии 15-20 Å друг от друга.

Полученные данные станут основой для наших дальнейших исследований вторичной структуры белка P80961. Установление структурных особенностей лед-связывающих белков может помочь в оптимальном выборе стратегии синтеза, улучшении свойств, а также увеличении выхода конечного продукта.

Литература

1. DeVries A. L., Wohlschlag D. E. Freezing resistance in some Antarctic fishes // Science. New York. 1969. Vol. 163. P. 1073–1075.
2. Chang A. Y., Chau V. W., Landas J. A., Pang Y. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation // JEMI-methods. 2017. Vol. 1. P. 22–25.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-110

ЗАГРУЗКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА ЛОШАДИ***LOADING OF OLIGONUCLEOTIDES INTO HORSE MILK EXOSOMES**

А. П. Парамоник, А. М. Тимофеева, С. Е. Седых, Г. А. Невинский

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

A. P. Paramonik, A. M. Timofeeva, S. E. Sedykh, G. A. Nevinsky

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ paramonik.ap@gmail.com

Аннотация

Использование экзосом молока для доставки терапевтически значимых препаратов является актуальным направлением в области современной молекулярной фармакологии. В данной работе для загрузки нуклеиновых кислот в экзосомы молока лошади использованы вспомогательные компоненты, увеличивающие эффективность загрузки.

Abstract

Use of milk exosomes for the delivery of therapeutic biomolecules is an important trend of modern molecular pharmacology. In this work, we loaded nucleic acids into horse milk exosomes using auxiliary components, which increase the efficiency of loading.

Актуальной проблемой доставки лекарственных средств является выбор агента доставки. В настоящее время широко используют синтетические катионные липосомы (липофектамин и его аналоги), к недостаткам которых можно отнести достаточно высокую токсичность и высокую стоимость. Перспективным вариантом для доставки лекарственных средств являются экзосомы молока — природные внеклеточные везикулы размером от 40 до 100 нм. Они биологически совместимы, безопасны, способны адресно доставлять загруженные молекулы. Экзосомы получают из культуральной жидкости, плазмы крови, слюны, мочи и других биологических жидкостей.

Молоко является единственным биологическим источником, содержащим экзосомы, который доступен в промышленных масштабах. Для использования экзосом в качестве агента доставки лекарственных средств необходимо оценить возможность и эффективность загрузки препаратов различной природы в экзосомы. В литературе описаны различные методы загрузки олигонуклеотидов в экзосомы, однако далеко не все они проверены на экзосомах молока. Данная работа направлена на анализ различных способов загрузки олигонуклеотидов в экзосомы молока лошади.

Экзосомы выделяли из молока лошади с помощью нескольких этапов центрифугирования, ультрацентрифугирования, дополнительной очистки от совыделяющихся белковых примесей методом гель-фильтрации. Для анализа эффективности доставки в экзосомы использовали плазмидную ДНК и 18-звенную микроРНК, меченую FAM. Олигонуклеотиды в экзосомы молока лошади загружали с применением вспомогательных компонентов: липофектамина, соевого лецитина, яичного лецитина и холестерина. Эффективность загрузки ДНК оценивали электрофорезом в агарозном геле, а микроРНК — электрофорезом в полиакриламидном геле. Расчет эффективности загрузки проводили в программе ImageQuant. Экзосомы использовали в двух разных разведениях: 1 : 50 и 1 : 1000. МикроРНК в трех разных концентрациях: 1 нг/мкл, 10 нг/мкл, 100 нг/мкл.

Вспомогательные компоненты позволяют значительно увеличить эффективность загрузки олигонуклеотидов в экзосомы, дальнейшие исследования будут посвящены оценке эффективности доставки загруженных в экзосомы олигонуклеотидов в культуры клеток и организмы модельных животных.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-74-10055.

© А. П. Парамоник, А. М. Тимофеева, С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-111

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА*****DIRECT REPROGRAMMING OF PATIENT FIBROBLAST INTO NEURON-LIKE CELLS
AS A PROMISING MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE**П. С. Парфенова^{1,2}, Н. А. Михайлова¹, М. Г. Хотин¹, Н. А. Красковская^{1,3}¹*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*²*Санкт-Петербургский государственный университет*³*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*P. S. Parfenova^{1,2}, N. A. Mikhailova¹, M. G. Khotin¹, N. A. Kraskovskaya^{1,3}¹*Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg*²*Saint Petersburg State University*³*Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University*✉ sucrederaisin@gmail.com**Аннотация**

Настоящая работа предлагает модифицированный метод прямого репрограммирования фибробластов здоровых доноров и пациентов с подтвержденным диагнозом болезни Хантингтона (БХ) в нейрон-подобные клетки, которые сохраняют весь набор эпигенетических изменений, влияющих на прогрессию поздно манифестирующего заболевания. Дифференцировка фибробластов человека по данной методике может стать начальной точкой преклинических исследований БХ.

Abstract

The existing research of molecular mechanisms of Huntington's disease (HD) progression, is expanded here by providing a modified method of direct reprogramming fibroblasts into neuron-like cells that keeps epigenetic changes important for late-onset HD progression. The HD cause seen as an expansion of CAG repeats within the Huntingtin gene. We anticipate our assay to be a starting point for preclinical trials on human cells rather than on mouse models.

Болезнь Хантингтона (БХ) является моногенным аутосомно-доминантным заболеванием. Болезнь вызвана экспансией глутаминовых повторов в первом экзоне гена *HTT (huntingtin)*, кодирующего белок хантингтин. Манифестация заболевания коррелирует с количеством этих CAG-повторов. Такой мутантный ген приводит к изменению аминокислотной последовательности белка в части формирования полиглутаминовых трактов. В результате хантингтин становится способен формировать агрегаты, что связывают с изменением морфологии нейронов. Более того, на поздних стадиях заболевания происходит массовая гибель нейронов преимущественно в области стриатума, а также клеток корковых структур мозга. При этом локализация патологических изменений осложняет изучение механизмов, лежащих в основе заболевания.

Основной целью данной работы является создание клеточной модели БХ, основанной на прямой дифференцировке фибробластов пациентов в нейрон-подобные клетки, которые сохраняют все основные эпигенетические возраст-ассоциированные изменения.

В работе использованы дермальные фибробласты, полученные от здоровых доноров и от пациентов с подтвержденным диагнозом БХ и разным количеством глутаминовых повторов. Клеточные линии были репрограммированы в нейрон-подобные клетки по модифицированному протоколу транс-дифференцировки [1]. Процесс транс-дифференцировки включал в себя: добавление лентивирусных векторов, кодирующих малые ядерные РНК и транскрипционные факторы, которые определяют дифференцировку клеток в средние шипиковые нейроны; культивирование фибробластов на протяжении 35–40 дней в среде с добавлением нейротрофических факторов. Морфологию полученных клеток оценивали методом конфокальной микроскопии после иммуофлуоресцентного окрашивания с антителами к белку MAP2. Анализ изображений проводили в программе NeuronStudio. Распределение хантингтина и его агрегатов также оценивали при помощи иммуофлуоресцентного окрашивания.

После дифференцировки полученные клетки приобретают фенотип нейроно-подобных клеток [2]. Репрограммированные фибробласты пациентов с БХ в сравнении с фибробластами здоровых доноров приобрели сле-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-75-00106.

дующие характеристики: менее ветвистое дендритное древо, короткие неразветвленные отростки. В $4,9 \pm 1,3$ % индуцированных нейронов от пациентов с БХ были обнаружены агрегаты хантингтина, тогда как в нейронах, дифференцированных из фибробластов здоровых доноров, агрегатов обнаружено не было ($p = 0,0044$).

Таким образом, метод прямого репрограммирования позволяет получить модель нейрон-подобных клеток, которая отражает основную характеристику патологии на клеточном уровне и может оценивать эффективность потенциальных лекарственных препаратов на доклинической стадии.

Литература

1. Kraskovskaya N.A., Bezprozvanny I.B. Normalization of Calcium Balance in Striatal Neurons in Huntington's Disease: Sigma 1 Receptor as a Potential Target for Therapy // *Biochemistry*. 2021. Vol. 86, № 4. P. 471–479.

2. Kraskovskaya N.A. et al. Protocol Optimization for Direct Reprogramming of Primary Human Fibroblast into Induced Striatal Neurons // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, № 7.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-112

СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОГЕЛЕЙ
НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ С НАСТРАИВАЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ
ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА*

CREATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROGELS BASED ON MODIFIED PECTINS
WITH CUSTOMIZABLE PROPERTIES FOR THE THERAPY OF BRAIN TUMORS

А. А. Патлай¹, М. Е. Шмелев¹, В. Е. Силантьев^{1,2}, А. С. Белоусов¹

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

²Институт химии ДВО РАН, Владивосток

A. A. Patlay¹, M. E. Shmelev¹, V. E. Silant'ev^{1,2}, A. S. Belousov¹

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok

²Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok

✉ patlay.al@mail.ru

Аннотация

Мы разработали пектиновые гидрогели и покрытия с регулируемыми вязкоупругими и структурными свойствами, подходящие для ремоделирования внеклеточного матрикса центральной нервной системы. Гидрогели показали противоопухолевый эффект в отношении клеток глиобластомы C6 и U87MG путем снижения клеточной пролиферации и миграции, что делает их перспективными материалами для комбинированной терапии глиомы.

Abstract

We have developed pectin hydrogels and coatings suitable for remodeling the extracellular matrix of the central nervous system with adjustable viscoelastic and structural properties. Hydrogels have shown antitumor effect on glioblastoma C6 and U87MG cultures by reducing cell proliferation and migration, which makes them promising materials for combination therapy of glioma.

Внеклеточное окружение во многом определяет поведение клеток посредством биохимических и механических сигналов. Так, пораженные глиомами ткани мозга гораздо более жесткие (свыше 1000 Па) по сравнению со здоровыми (100–1000 Па) [1, 2]. Взаимодействие клеток с биоматериалами имеет важное значение для правильного функционирования тканей в ходе процессов репарации и регенерации. Поэтому для биомедицинских целей предпочтительнее использовать биоматериалы с настраиваемыми свойствами, имитирующие нативный внеклеточный матрикс (ВКМ).

Одним из таких перспективных полимеров является растительный полисахарид пектин, который образует биосовместимые, биоразлагаемые, нетоксичные гидрогели по механизму ионного гелирования. Благодаря этим особенностям и сходству с главным компонентом ВКМ центральной нервной системы (ЦНС) — гиалуроновой кислотой, пектиновые гидрогели в форме трехмерных каркасов и функционализируемых покрытий способны направлять активность клеток нейрального ряда и представляют интерес в противопухолевой терапии.

Мы разработали гидрогели и гидрогелевые покрытия на основе пектинов разной концентрации и разной степени этерификации (СЭ), т. е. соотношения числа этерифицированных карбоксильных групп к свободным. Вязкоупругие свойства полученных образцов соответствовали физиологичному для ЦНС диапазону и достаточно легко изменялись при увеличении концентрации и СЭ пектина. По своей структуре гидрогели и покрытия являются мезопористыми образованиями, размер пор и плотность которых возможно изменять для достижения лучшего взаимодействия с нервными клетками. Кроме того, мы изучили особенности набухания гидрогелей разной СЭ и их стабильность *in vitro*. Материалы с высокой СЭ показали большую влагоудерживающую способность, чем гели с низкой СЭ, но меньшую степень максимального набухания. Таким образом, мы продемонстрировали возможность подбора характеристик пектиновых гидрогелей под конкретные биомедицинские задачи [3].

* Работа выполнена в рамках проекта № FZNS-2023-0017 «Биоинженерные системы и молекулы морских организмов для создания биофармацевтических и биомедицинских технологий».

Исследования проводились на базе Лаборатории биомедицинских клеточных технологий ДВФУ. Электронно-микроскопические исследования проведены при поддержке Дальневосточного центра электронной микроскопии, Национального научного центра морской биологии им. А. В. Жирмунского.

© А. А. Патлай, М. Е. Шмелев, В. Е. Силантьев, А. С. Белоусов, 2023

Мы также продемонстрировали антиглиомный потенциал полученных гидрогелей и покрытий за счет снижения пролиферативной и метаболической активности клеток глиобластомы C6 и U87MG, культивируемых на наших гелях, при сохранении высокого уровня жизнеспособности. Также мы показали усиление ингибирующего эффекта гидрогелей из пектинов высокой СЭ по сравнению с гелями из пектинов низкой СЭ на метаболизм опухолевых клеток [3].

По совокупности своих свойств биоматериалы на основе пектина успешно имитируют нативный ВКМ головного мозга и способствуют снижению агрессивности и инвазивности опухолевых клеток, что делает их перспективными материалами для комбинированной терапии глиомы.

Литература

1. Flanagan L.A., Ju Y.-E., Marg B. et al. Neurite Branching on Deformable Substrates // *Neuroreport*. 2002. Vol. 13. P. 2411–2415.
2. Previtara M. L. Hui M., Verma D. et al. The Effects of Substrate Elastic Modulus on Neural Precursor Cell Behavior // *Annals of Biomedical Engineering*. 2013. Vol. 41. P. 1193–1207.
3. Belousov A., Patlay A., Silant'ev V. et al. Preparation of Hydrogels Based on Modified Pectins by Tuning Their Properties for Anti-Glioma Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Vol. 24. P. 630.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-113

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТХОДОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ****THE USE OF WASTE FROM PHARMACEUTICAL PRODUCTION
FOR THE CREATION OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS**

О. А. Петренко, О. В. Самылова, А. А. Кузнецова, Ю. В. Щербакова, Ф. Ю. Ахмадуллина

Казанский национальный исследовательский технологический университет

O. A. Petrenko, O. V. Samylova, A. A. Kuznetsova, Yu. V. Shcherbakova, F. Y. Akhmadullina

Kazan National Research Technological University

✉ balakirevajulia3@mail.ru

Аннотация

Состояние окружающей среды, избыточное потребление синтетических лекарственных средств, пищевых добавок и консервантов оказывают существенное влияние на биологическое производство свободных радикалов, лежащих в основе целого ряда заболеваний и патологических состояний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, онкологические заболевания и др. Для коррекции указанных состояний и в профилактических целях все чаще применяют растительное сырье, содержащее большой набор антиоксидантов: витаминов, флавоноидов и дубильных веществ, обладающих мягким воздействием на организм и сравнительно низкой токсичностью. Однако даже после производства таких органически чистых препаратов остается большой объем органических отходов, которые можно повторно использовать. Например, сбор элеутерококка колючего составляет 400 тонн в год. Цели данной работы — изучение шрота элеутерококка, образующегося при производстве жидкого экстракта на его основе, и рассмотрение возможности его дальнейшего использования для получения биотехнологических продуктов.

Abstract

The state of the environment, excessive consumption of synthetic medicines, food additives and preservatives have a significant impact on the biological production of free radicals underlying a number of diseases and pathological conditions, such as atherosclerosis, coronary heart disease, oncological diseases and others. To correct these conditions and for preventive purposes, vegetable raw materials containing a large set of antioxidants are increasingly used: vitamins, flavonoids and tannins with a mild effect on the body and relatively low toxicity. However, even after the production of such organically pure preparations, a large amount of organic waste remains that can be reused. Only the collection of *Eleutherococcus prickly* is 400 tons per year. In this regard, the purpose of this work is to study the *eleutherococcus meal* formed during the production of a liquid extract based on it and to consider the possibility of its further use for obtaining biotechnological products.

Шрот, образующийся при получении экстракта из элеутерококка колючего на АО «Татхимфармпрепараты» (г. Казань), является отходом класса Г [1], утилизация которого является платной. При несвоевременном вывозе отходов (не более 11 мес.) на завод налагаются санкции.

Следовательно, транспортирование отходов в настоящее время является статьей расходов для предприятия. Согласно литературным данным [2], шрот может являться недорогим источником остаточных биологически активных веществ. В связи с этим целью данной работы является разработка «сценария» по безотходному производству фитоэкстракта — использование шрота для получения продуктов биотехнологического назначения.

В работе предлагается следующий пользовательский сценарий безотходной утилизации шрота элеутерококка:

1) получение водных экстрактов из шрота и использование их в качестве компонента для выращивания хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*;

2) дальнейшее использование шрота в качестве субстрата для выращивания плодовых грибов на малых предприятиях.

Для подтверждения возможности данных направлений использования шрота элеутерококка нами были получены водные экстракты шрота следующими методами (гидромодуль 1 : 4):

1) мацерация при комнатной температуре (без перемешивания, 24 ч);

2) мацерация при температуре 100 °С;

3) мацерация при температуре 70 °С (скорость перемешивания — 500 об/мин; время экстрагирования — 1,5 ч).

Все три полученных экстракта из шрота элеутерококка для начала были проанализированы на наличие в них основных биологических компонентов, необходимых для роста микроорганизмов, с помощью качественных реакций: белки, углеводы, флавоноиды, поскольку растительное сырье является их богатейшим источником. Кроме того, в работе определяли наличие и содержание таких важнейших факторов роста и антиоксидантов для дрожжей, как витамины: никотинамид (качественные реакции), тиамин (качественные реакции), аскорбиновая кислота (титриметрический метод с использованием в качестве титранта щелочного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола), рутин (титриметрический метод с использованием в качестве титранта раствора KMnO_4). Дополнительно в работе оценивали антиоксидантную активность фитоэкстрактов тремя методами: суммарным определением водорастворимых антиоксидантов по методу Рогожина [3]; методом DPPH [4] и кулонометрическим титрованием электрогенерированным бромом [5].

Результаты

1. Все исследованные фитоэкстракты содержали белки, углеводы, флавоноиды и витамины группы В, С и Р.

2. Было определено содержание аскорбиновой кислоты и рутина в исследуемых экстрактах. Наибольшее содержание аскорбиновой кислоты было выявлено в экстракте шрота элеутерококка, полученного методом мацерации при 100 °С (4,19 мг%); наименьшее — для экстракта, полученного с помощью метода мацерации при комнатной температуре (2,94 мг%). Наибольшее содержание рутина было выявлено в экстракте шрота элеутерококка, полученного методом мацерации при 70 °С (11,87 мг/кг); наименьшее — для экстракта, полученного с помощью метода мацерации при комнатной температуре (7,20 мг/кг).

3. Все фитоэкстракты обладали антиоксидантной активностью: наибольшее содержание водорастворимых антиоксидантов было выявлено в экстракте шрота элеутерококка, полученного методом мацерации при 70 °С (0,064 мг/г); наименьшее — для экстракта, полученного с помощью метода мацерации при комнатной температуре (0,022 мг/г).

4. Что касается выращивания грибов, то шрот как отход фитосырья является богатым источником целлюлозы, которая необходима для культивирования высших грибов.

Таким образом, в работе выявлены и оценены основные биологически активные вещества шрота элеутерококка и предложены направления переработки отхода: экстракт шрота как компонент питательной среды для культивирования дрожжей, а шрот после вторичного экстрагирования можно использовать в качестве субстрата для выращивания плодовых грибов.

Литература

1. СанПиН 2.1.3684-21. Санитарные правила и нормы. Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. Введ. 2021.01.28. М: Центрмг, 2023. 92 с.
2. Kaeser P. S., Regehr W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release // *Annual review of physiology*. 2014. Vol. 76. P. 333–363.
3. Базарнова Ю. Г., Иванченко О. Б. Исследование состава биологически активных веществ экстрактов дикорастущих растений // *Вопросы питания*. 2016. № 5. С. 100–107.
4. Шевелев Г. Ю., Переверзев И. М., Кечин А. А. и др. Коррекция ошибок при ферментативной сборке протяженных последовательностей ДНК // *Биотехнология — медицине будущего: Материалы всеросс. мультikonф. с междунар. участием, Новосибирск, 29 июня — 2 июля 2019 г.* Новосибирск: Офсет-ТМ, 2019. С. 91.
5. Борисова Г. Г. и др. Методы оценки антиоксидантного статуса растений: учеб.-метод. пособие. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2012. 72 с.
6. Акулов А. Н., Гумерова Е. А., Костюкова Ю. А. и др. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: уч.-метод. пособие. Казань: Казан. гос. технол. ун-т, 2012. 51 с.
7. Лапин А. А. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе МВИ 01-44538054-07. Свидетельство об аттестации МВИ № 4, выданное федеральным государственным учреждением «Тамбовский центр стандартизации, метрологии и сертификации».

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-114

**МАГНИТНЫЕ НАНОГИБРИДЫ СМЕШАННОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ
ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА*****MAGNETIC NANOHYBRIDS OF MIXED IRON OXIDE AND CALCIUM CARBONATE
FOR TARGETED DOXORUBICIN DELIVERY**

В. К. Попова, Е. В. Дмитриенко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

V. K. Popova, E. V. Dmitrienko

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ elenad@niboch.nsc.ru

Аннотация

Работа направлена на получение и исследование свойств наночастиц (НЧ) карбоната кальция и их композитов со смешанным оксидом железа размером менее 200 нм. Продемонстрированы высокая эффективность связывания НЧ с доxorубицином и нуклеиновыми кислотами и pH-зависимый профиль разрушения взаимодействия с лекарством. НЧ не обладают токсическим эффектом, а их связанный с доxorубицином вариант не уступает по эффективности индивидуальному лекарству.

Abstract

This work is aimed at obtaining and studying the properties of calcium carbonate nanoparticles (NPs) and their composites with mixed iron oxide less than 200 nm in size. High binding efficiency of NPs with doxorubicin and nucleic acids, as well as pH-dependent degradation profile of drug interaction were demonstrated. The NPs have no toxic effect, and their doxorubicin-bound version is not inferior in efficacy to the individual drug.

Наноразмерный карбонат кальция широко используется в разработке инструментов доставки противораковых агентов благодаря биосовместимости и pH-лабильности [1]. Однако ввиду низкой суспензионной стабильности материалов на основе карбоната кальция размером до 200 нм его применимость в качестве инструментов адресных систем доставки лекарственных средств ограничена, особенно на этапах функционализации поверхности носителя [2].

Целью данной работы является создание и испытание направленной системы доставки противоопухолевых препаратов на основе карбоната кальция. Для ее достижения использовали современные подходы молекулярной биологии и биотехнологии, а именно: методы динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии, спектрофотометрии, инфракрасной спектроскопии, а также стандартные протоколы для исследования цитотоксичности веществ.

Первая часть работы посвящена разработке воспроизводимых протоколов получения стабильной суспензии наноматериалов карбоната кальция с детальным рассмотрением влияния компонентов реакционной смеси на размер, дисперсность и формирование ультратонкой структуры частиц [3]. Для наночастиц карбоната кальция, характеризующихся монодисперсностью и размером 200 нм (CaCO_3), показана эффективность связывания с противоопухолевым агентом и нуклеиновыми кислотами. Клеточные испытания доказали эффективность разработанных конструкций в качестве носителей лекарственных средств, а также безопасность индивидуальных наночастиц [3].

В продолжении работы предложены способы комбинирования CaCO_3 с магнитными наноматериалами (Fe_3O_4) для получения гибридных свойств, включающих гипертермию, магнитно-резонансную визуализацию, направленную доставку препаратов под действием магнитного поля и pH-лабильность. Полученный нанокомпозит смешанного оксида железа и карбоната кальция ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CaCO}_3$) размером ~ 135 нм характеризуется коллоидной стабильностью как в водных растворах, так и физиологических средах, отсутствием цитотоксичности и выраженными магнитными свойствами. Кроме того, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CaCO}_3$ продемонстрировал сверхвысокие емкостные характеристики по отношению к противоопухолевому препарату доxorубицину (DOX), вплоть до 1900 мкг/мг ($\text{DOX}/\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CaCO}_3$). Профили высвобождения лекарства из состава нанокомпозита показали выраженную pH-лабильность $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{CaCO}_3$: удержание лекарства при физиологическом pH и более чем 80%-е высвобождение DOX

* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

© В. К. Попова, Е. В. Дмитриенко, 2023

в условиях, близких к опухолевым. Кроме того, исследования на линиях клеток показали эффективность конструкции, несущей доксорубин ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CaCO}_3/\text{DOX}$) в ингибировании клеточной активности: всего 1,5 мкг $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CaCO}_3/\text{DOX}$ достаточно для ингибирования 50 % клеток.

Испытание $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CaCO}_3$ доказало потенциал наноплатформы в биомедицине и заслуживает продолжения исследований.

Литература

1. Trushina D.B., Borodina T.N., Belyakov S. et al. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges // *Materials Today Advances*. 2022. Vol. 14. P. 100214.
2. Liendo F., Arduino M., Deorsola F.A., Bensaid S. Factors controlling and influencing polymorphism, morphology and size of calcium carbonate synthesized through the carbonation route: A review // *Powder Technology*. 2022. Vol. 398. P. 117050.
3. Popova V.K., Poletaeva Y.E., Pyshnaya I.A. et al. Designing pH-dependent systems based on nanoscale calcium carbonate for the delivery of an antitumor drug // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11 (11). P. 2794.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-115

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА
НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ТЕЛЯТ**

THE EFFECT OF METABIOTIC DRUG ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF CALVES' BLOOD

И. А. Пушкарев¹, В. А. Мартынов¹, Т. В. Куренинова¹, И. Ю. Евдокимов², А. Н. Иркитова²

¹Федеральный Алтайский научный центр агробιοтехнологий, Барнаул

²Алтайский государственный университет, Барнаул

I. A. Pushkarev¹, V. A. Martynov¹, T. V. Kureninova¹, I. Yu. Evdokimov², A. N. Irkitova²

¹Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Barnaul

²Altai State University, Barnaul

✉ pushkarev.88-96@mail.ru

Аннотация

В статье представлены результаты исследований, целью которых было изучение влияния метабитического препарата на биохимические показатели крови телят. В результате скармливания телятам молочного периода выращивания метабитической кормовой добавки в дозе 20 мл/гол. отмечалось увеличение содержания в сыворотке крови альбуминов на 3,7 % ($p \leq 0,001$), АСаТ на 3,3 % ($p \leq 0,05$), АЛаТ на 38,2 % ($p \leq 0,001$).

Abstract

The article presents the results of studies aimed at studying the effect of a metabiotic drug on the biochemical parameters of the blood of calves. As a result of feeding the calves of the dairy period of growing a metabiotic drug at a dose of 20 ml/head, an increase in the serum content of albumins by 3,7 % ($p \leq 0,001$), ASaT by 3,3 % ($p \leq 0,05$), ALaT by 38,2 % ($p \leq 0,001$) was noted.

Введение

При рождении кишечник телят относительно стерил. Его заселение нормальной микрофлорой протекает постепенно и завершается к 20-25 дню после рождения. Отсутствие у телят в первые недели жизни полноценного кишечного микробиоценоза, способного обеспечить колонизационную резистентность кишечника, создает условия для возникновения массовых желудочно-кишечных болезней бактериальной вирусной и другой этиологии [1].

В настоящее время ветеринарные специалисты проявляют большой интерес к применению пробиотиков для сохранения и поддержания здоровья животных. Самое главное при этом — использование пробиотиков не вызывает привыкания к ним патогенной микрофлоры, они абсолютно безвредны и экологически чисты [2].

Также желудочно-кишечный тракт является «реактором проточного типа», что свидетельствует о быстрой изменчивости микробиологических культур. Через 2-3 недели культивирования в таком «реакторе» остаются только наиболее быстро растущие и адаптированные штаммы, при этом остальные выводятся с калом во внешнюю среду. Клинический эффект пробиотических препаратов ограничен во времени и зачастую действует в течение его приема. Поэтому появляется необходимость поиска новых средств более продолжительного действия. К таким препаратам относятся метабитики, которые преимущественно стимулируют рост своей микробиоты [3].

Метабитики представляют собой метаболиты в надосадочной (культуральной) жидкости, полученной в результате культивирования пробиотических бактерий, оказывающие при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина путем стабилизации и оптимизации функции его нормальной микрофлоры [4].

Метабитики — полезные метаболитические продукты пробиотических бактерий, которые не только способствуют росту полезной микрофлоры, но и подавляют патогенную. Метабитики создают благоприятное окружение для полезных бактерий и для эпителия кишечника, оказывают положительное влияние на естественную резистентность и уровень обмена веществ [5].

В связи с этим целью наших исследований стало изучение влияния метабитического препарата на биохимические показатели крови телят.

Материал и методы исследования

Эксперимент проведен в 2023 г. в производственных условиях филиала «Опытная станция» ПЗ «Комсомольское» ФГБНУ ФАНЦА Павловского района Алтайского края на телятах молочного периода выращивания черно-пестрой породы. Схема эксперимента представлена в табл. 1.

Для проведения эксперимента нами было сформировано 2 подопытных группы телят, по 7 голов в каждой, аналогов по возрасту (2-3 день после рождения) и живой массе ($20,0 \pm 0,6$ кг).

Таблица 1

Схема научно-хозяйственного эксперимента

Группа	n	Условия кормления	Период скармливания метабитического препарата, сут
Контрольная	10	Основной хозяйственный рацион	-
Опытная	10	ОР + 20 мл/гол. метабитического препарата со 2-3 дня после рождения	30

Опытная партия метабитического препарата разработана и изготовлена на базе лабораторного комплекса ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета, представляет собой жидкую форму активных метаболитов, полученных при культивировании дрожжевого пробионта *Kluyveromyces lactis*. Данный препарат имеет темно-коричневый цвет и не имеет резко выраженного запаха.

Скармливание метабитика телятам опытной группы осуществлялось путем введения исследуемого препарата в выпаиваемое молоко в дозе 20 мл/гол. Кровь для биохимических исследований отбирали на 30-й день скармливания метабитического препарата. Забор крови у животных подопытных групп осуществляли в утренние часы до кормления из яремной вены. Кровь отбирали в вакуумные пробирки.

Биохимические исследования полученных проб сыворотки крови проводили в Алтайском НИИ животноводства и ветеринарии в лаборатории ветеринарии на биохимическом анализаторе ChemWellCombi 2910 с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест», согласно инструкции по применению данных наборов.

Результаты, полученные в ходе эксперимента, обрабатывали с использованием методов биометрической обработки (вычисляли среднеарифметическое значение (M), среднеквадратическую ошибку ($\pm m$) и критерий достоверности (p) при помощи программного пакета Microsoft Excel 2016). Достоверность результатов исследований по отношению к контрольной группе рассчитывали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок.

Результаты

Весьма важной жизненной средой для всех клеток, тканей и органов животных является кровь. Она доставляет клеткам органов тела питательные вещества и кислород, удаляет продукты обмена и углекислоту [6]. Учитывая важнейшие свойства крови, нами изучены ее биохимические показатели у животных подопытных групп (табл. 2).

Проведя анализ данных, представленных в табл. 2, можно заключить, что введение в состав рациона телят молочного периода выращивания метабитической кормовой добавки в дозе 20,0 мл/гол. способствовало тенденции в сторону увеличения содержания в их сыворотке крови общего количества белка на 0,9 %. Концентрация альбуминов в сыворотке крови телят опытных групп находилась на большем уровне на 3,7 % ($p \leq 0,05$) в сравнении с контрольными значениями.

Таблица 2

Биохимические показатели сыворотки крови телят

Показатель	Группа	
	Контрольная	Опытная
Общий белок, г/л	$63,7 \pm 1,69$	$64,3 \pm 2,10$
Альбумины, г/л	$31,8 \pm 0,22$	$33,0 \pm 0,50$
Холестерин, ммоль/л	$2,5 \pm 0,20$	$2,3 \pm 0,23$
Триглицериды, ммоль/л	$0,7 \pm 0,12$	$0,6 \pm 0,05$
АСаТ, ед/л	$78,0 \pm 0,71$	$80,6 \pm 0,81$
АЛаТ, ед/л	$13,6 \pm 0,81$	$18,8 \pm 0,59$
Кальций, ммоль/л	$2,70 \pm 0,05$	$2,75 \pm 0,06$
Фосфор, ммоль/л	$3,02 \pm 0,15$	$3,18 \pm 0,08$
Рез. щелочность, мг%	$404,0 \pm 7,48$	$410,0 \pm 6,83$

Альбумины являются одними из основных сывороточных белков. Кроме поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма альбумины осуществляют транспортировку к органам и тканям различных биологически активных веществ, гормонов, витаминов, а также холестерина, билирубина, кальция и т. д. Большее содержание альбуминов в сыворотке крови животных опытных групп свидетельствует об усилении в организме окислительно-восстановительных процессов и отражает их интенсивный рост [6].

Содержание в сыворотке крови телят опытных групп ферментов преаминирования АСаТ и АЛаТ было выше на 3,3 % ($p \leq 0,05$) и 38,2 % ($p \leq 0,001$) соответственно, в сравнении с аналогичными значениями в контрольной группе животных. Ранее сообщалось о тенденции в сторону увеличения содержания общего количества белка и повышения уровня альбуминов в сыворотке крови молодняка опытных групп. Активный синтез белков связан с процессами преаминирования, в результате чего повышается концентрация трансаминаз в сыворотке крови [7].

В сыворотке крови животных, получавших исследуемую кормовую добавку, отмечалась тенденция в сторону увеличения содержания кальция и фосфора на 1,8 % и 5,2 % соответственно, относительно контрольных значений. Уровень резервной щелочности сыворотки крови телят опытных групп также был выше на 1,4 % в сравнении с контролем, однако указанные разницы статистически недостоверны.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что введение в состав рациона телят опытных групп метабиотической кормовой добавки способствовало увеличению некоторых показателей белкового обмена веществ, в частности, отмечалось увеличение концентрации альбуминов на 3,7 % ($p \leq 0,05$), ферментов АСаТ на 3,3 % ($p \leq 0,05$) и АЛаТ на 38,2 % ($p \leq 0,001$), что является благоприятным фактором, который может оказать стимулирующее влияние на увеличение темпов роста животных опытной группы.

Литература

1. Скопичев В. Г., Максимюк Н. Н. Физиолого-биохимические основы резистентности животных: учеб. пособие. СПб.: Издательство «Лань», 2009. С. 352
2. Бурцева Т. В. Экологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии // Аграрный вестник Урала. 2013. № 7 (113). С. 15–17.
3. Нечисляев В. А., Мокин П. А., Федорова Т. В. К вопросу разработки высокоэффективных метаболитных пробиотиков // Сибирский медицинский журнал. 2016. № 2. С. 15–17.
4. Чичерин И. Ю., Погорельский И. П., Дармов И. В. и др. Пробиотики: вектор развития // Практическая медицина. 2012. № 3 (58). С. 185–193.
5. Неминущая Л. А., Павленко И. В., Казаку А. А. и др. Инновационные синбиотики для сельскохозяйственных животных и птицы // Ветеринарный врач. 2023. № 1. С. 42–50.
6. Саломатин В. В., Злепкин В. А., Будтуев О. В. Влияние треонина и ферментных препаратов на морфологический и биохимический состав крови у подопытных свиней на откорме // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. 2010. № 1 (17). С. 80–86.
7. Маслюк А. Н., Беляев И. Н., Токарева М. А. Эффективность использования кормовой добавки Иммуносан при выращивании телят // Известия Оренбургского государственного университета. 2020. № 1 (81). С. 184–188.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-116

**IN VITRO СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ААВ-ВЕКТОРОВ
ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ****IN VITRO SYSTEM BASED ON AAV-VECTORS
FOR TESTING NEURON-SPECIFIC PROMOTERS**А. Д. Романова^{1,2}, Е. А. Лунев¹⁻³, М. В. Бардина¹⁻³¹Институт биологии гена РАН, Москва²ООО «Марлин Биотех», Сочи³Центр высокоточного редактирования
и генетических технологий для биомедицины, МоскваA. D. Romanova^{1,2}, E. A. Lunev¹⁻³, M. V. Bardina¹⁻³¹Institute of Gene Biology RAS, Moscow²Marlin Biotech, LLC, Sochi³Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow

✉ Anna.Dergileva@student.msu.ru

Аннотация

Для безопасности генной терапии важна тканеспецифичная экспрессия трансгена. Известные нейрональные промоторы обеспечивают низкую эффективность и/или специфичность экспрессии трансгена. Для тестирования новых нейроспецифичных промоторов в настоящей работе была разработана *in vitro* система с использованием ААВ-векторов в первичной нейрональной и глиальной культурах.

Abstract

Tissue-specific transgene expression is important for safety of gene therapy. Commonly used neuron-specific promoters provide a low level of efficiency and/or specificity of transgene expression. In this study, we developed an *in vitro* system based on AAV vectors, primary neuronal and glial cultures for screening new neurospecific promoters.

Эффективность генной терапии зависит от уровня экспрессии терапевтической конструкции, а на безопасность препарата влияет его специфичность к целевым клеткам и тканям. Одним из подходов для обеспечения таргетной экспрессии является использование тканеспецифичного промотора, регулирующего экспрессию генетической конструкции. Известные на сегодняшний день нейрональные промоторы обладают низкой эффективностью и/или характеризуются слабой специфичностью, а также существуют противоречия в определении границ уже описанных промоторов. Задача данной работы заключалась в создании и оптимизации *in vitro* системы для тестирования потенциальных нейрональных промоторов. Ранее в нашей лаборатории был разработан аденоассоциированный вирусный вектор (ААВ-вектор), в котором перед репортерным геном GFP расположены сайты рестрикции для клонирования тестируемого промотора. Для нормализации сигнала от GFP и оценки множественности инфекции в векторе закодирован репортерный белок FusionRed под контролем CMV-промотора [1]. На основе этого вектора мы создали контрольный набор ААВ-векторов для скрининга нейрональных промоторов. Было получено три плазмидных конструкции, экспрессия GFP в которых находится под контролем одного из трех промоторов: конститутивного CMV-промотора в качестве положительного контроля, промотора человеческого синапсина I (hSynI) как классического и широко используемого нейронального промотора и мышечного промотора сердечного тропонина Т (сTnT) в качестве отрицательного контроля.

Мы протестировали конструкции на первичной нейрональной и глиальной культурах, полученных из цельного мозга мыши. Для доставки конструкции в клетки ААВ-векторы были упакованы в вирусные частицы серотипа DJ и очищены в иодиксаноловом градиенте. Полученными вирусами клетки инфицировали в количестве $1,00E + 11$ геномных копий на лунку 24-луночного планшета. Оценка экспрессии репортерных генов GFP и FusionRed проводилась методами флуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга на 7-й день после заражения. Под контролем CMV-промотора GFP экспрессировался на высоком уровне в обеих клеточных культурах, в то время как экспрессия под контролем промотора hSynI была обнаружена только в нейрональной

культуре. Экспрессию GFP под контролем сTnT промотора мы не наблюдали ни в одной из культур. Разработанная нами *in vitro* система на основе AAV-векторов первичной нейрональной и глиальной культур мыши в дальнейшем будет использована для тестирования новых нейроспецифичных промоторов, отобранных по результатам биоинформатического анализа.

Литература

1. Скопенкова В. В., Жерновков В. Е., Старикова А. В., Егорова Т. В. Создание нового синтетического мышечно-специфического промотора // Гены & Клетки. 2019. Т. 14. С. 215–215.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-117

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММА *BACILLUS PUMILUS* 3-19***ANTAGONISTIC POTENTIAL OF THE *BACILLUS PUMILUS* 3-19 STRAIN**

Н. Л. Рудакова, И. В. Хиляс, Д. И. Хасанов, М. Р. Шарипова

Казанский федеральный университет

N. L. Rudakova, I. V. Khilyas, D. I. Khasanov, M. R. Sharipova

Kazan Federal University

✉ natalialrudakova@mail.ru

Аннотация

Штамм *B. pumilus* 3-19 обладает устойчивостью к стрептомицину и повышенной экспрессией некоторых внеклеточных гидролаз. Оценка его потенциала в качестве PGP-штамма показала, что *B. pumilus* 3-19 проявил выраженную антагонистическую активность по отношению к патогенным бактериям *Pectobacterium carotovorum* и *Xanthomonas vesicatoria* и не проявил антагонизма по отношению к фитопатогенным микромицетам *Fusarium oxysporum* DR57 и *Alternaria solani*.

Abstract

B. pumilus strain 3-19 is resistant to streptomycin and has increased expression of some extracellular hydrolases. Evaluation of its potential as a PGP strain showed that *B. pumilus* 3-19 exhibited pronounced antagonistic activity against pathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum* and *Xanthomonas vesicatoria* and did not show antagonism against phytopathogenic micromycetes *Fusarium oxysporum* DR57 and *Alternaria solani*.

Фитопатогенные микроорганизмы являются значительной угрозой для культурных растений. При этом борьба с ними методом внесения синтетических препаратов может приводить к долгосрочным загрязнениям экосистемы, а также к гибели части полезной микрофлоры почвы. При этом многие ризосферные штаммы бактерий обладают способностью к синтезу антимикробных соединений с направленным механизмом действия против фитопатогенов. Оптимальным решением может стать использование подобных биопротекторных штаммов микроорганизмов в качестве агентов защиты промышленно значимых растений. Штамм *B. pumilus* 3-19 является производным природного изолята *B. pumilus* 7P с приобретенной устойчивостью к стрептомицину, а также повышенной активностью внеклеточных гидролаз.

Цель исследования — оценка антагонистических активностей штамма *B. pumilus* 3-19 по отношению к фитопатогенным бактериям и микромицетам.

Анализ генома *B. pumilus* 3-19 показал наличие гена сидерофора бациллибактина и генов биосурфактантов. Известно, что эти соединения могут обладать антимикробной активностью.

Оценка антимикробной активности проводилась по отношению к фитопатогенным бактериям *Pectobacterium carotovorum* PCA 2a и *Xanthomonas vesicatoria*. *Pectobacterium carotovorum* — грамтрицательная палочковидная бактерия семейства *Enterobacteriaceae*, облигатный паразит растений и опасный фитопатоген с широким кругом хозяев. *Xanthomonas vesicatoria* — фитопатогенные бактерии, грамтрицательные палочки, аэробы, возбудители болезней томата, перца и картофеля.

Суспензию культуры *Bacillus pumilus* 3-19 точно вносили на предварительно высеванную газонную культуру фитопатогена и выращивали при 30 °С. Зона ингибирования роста обоих патогенов наблюдалась на 48-й час роста и была обширнее для *Xanthomonas vesicatoria*.

Для оценки фунгистатической активности штамма *Bacillus pumilus* 3-19 были выбраны штаммы микромицетов *Alternaria solani* и *Fusarium oxysporum* DR57. *Alternaria solani* является грибковым патогеном, вызывающим заболевание томата и картофеля, называемое ранним фитотфозом. *Fusarium oxysporum* — важнейший фитопатоген, вызывает фузариозное увядание картофеля.

Штамм *Bacillus pumilus* 3-19 не проявил фунгистатической активности против выбранных фитопатогенных микромицетов. Хотя фунгистатическая активность *B. pumilus* 3-19 в отношении *Alternaria solani* и *Fusarium oxysporum* DR57 не была обнаружена, литературные данные указывают на возможность наличия у *B. pumilus* 3-19 активности против других фитопатогенных грибов.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 22-16-00138.

© Н. Л. Рудакова, И. В. Хиляс, Д. И. Хасанов, М. Р. Шарипова, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-118

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРИАЗИНИЛАМИДОФОСФАТА
ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ АСО И СЛОЖНЫХ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ****USE OF TRIAZINYLAMIDOPHOSPHATE FOR INTRACELLULAR DELIVERY
OF ASO AND COMPLEX DNA CONSTRUCTS**

Д. С. Рыбалко¹, В. Д. Дрозд¹, К. Патра¹, А. А. Эльдиб^{1,2},
Т. Д. Жарков³, М. С. Купрюшкин³, Д. М. Колпашчиков²⁻⁶

¹Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

²Альметьевский государственный нефтяной институт

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

⁴Химический факультет Университета Центральной Флориды, Орландо, США

⁵Школа биомедицинских наук Бернетта Университета центральной Флориды, Орландо, США

⁶Национальный центр судебной экспертизы Университета Центральной Флориды, Орландо, США

D. S. Rybalko¹, V. D. Drozd¹, C. Patra¹, A. A. Eldeeb^{1,2},
T. D. Zharkov³, M. S. Kuprushkin³, D. M. Kolpashchikov²⁻⁶

¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

²Almetyevsk State Oil Institute

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

⁴Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA

⁵Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA

⁶National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA

✉ rybalko@scamt-itmo.ru

Аннотация

Большинство препаратов генной терапии — олигонуклеотиды, которые не могут самостоятельно пересекать клеточную мембрану, для их доставки используются различные системы и модификации. Триазиниламидофосфат способен облегчать прохождение цепей ДНК в клетку. Он обеспечивает высокую эффективность доставки и демонстрирует меньшую цитотоксичность по сравнению с липосомами. Далее мы разработали модифицированный носитель АСО с целью его самодоставки.

Abstract

Most gene therapy agents are oligonucleotides that cannot cross the cell membrane on their own, thus various delivery systems and modifications are used. We tested the ability of triazinylamidophosphate, a lipophilic modification, to facilitate the passage of DNA strands into the cytoplasm. It ensures high efficiency of delivery and shows lower cytotoxicity in comparison with liposomes. Next, we designed a modified ASO carrier to achieve self-delivery.

Генная терапия является перспективным подходом к лечению различных заболеваний. Однако ее успех в значительной степени зависит от эффективности доставки терапевтических агентов в клетки-мишени. К числу основных проблем относятся мембранные барьеры, эндосомальная интернализация, нецелевая доставка, токсичность и иммунный ответ [1, 2].

Биоконъюгаты показали свою перспективность в качестве средств внутриклеточной доставки терапевтических агентов [3–5]. Целью данного исследования является создание нетоксичного носителя сложных ДНК-конструкций с помощью биоконъюгатов, который будет способствовать их самодоставке в клетки-мишени, минуя эндосомальный захват.

Мы решили разработать носитель антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) — коротких одноцепочечных молекул ДНК, которые могут специфически связываться последовательностями РНК в клетке и модулировать экспрессию генов. Когда АСО связывается с РНК-мишенью, он может предотвратить трансляцию РНК в белок, блокируя сайт связывания с рибосомой, или вызвать деградацию молекулы РНК с помощью РНКазы H [6].

В качестве липофильной модификации мы выбрали триазиниламидофосфат с двумя додецильными остатками, который был разработан и синтезирован нашим коллегами из ИХБФМ СО РАН [7].

Сначала мы подтвердили низкую цитотоксичность этой модификации. Результаты МТТ-анализа показали, что олигонуклеотиды, содержащие триазиныламидофосфат, обладают более низким цитотоксическим эффектом и обеспечивают выживаемость клеток на 20–40 % выше, чем немодифицированные олигонуклеотиды той же последовательности, доставляемые с помощью липосом, при концентрации от 125 до 2000 нМ.

Для подтверждения того, что триазиныламидофосфат способствует доставке одноцепочечных олигонуклеотидов в клетку, мы использовали олигонуклеотиды с флуоресцентными метками. По результатам проточной цитометрии модифицированные олигонуклеотиды показывают эффективность трансфекции более 98 % при концентрации 1 мкМ после 4 ч инкубации, что даже выше, чем при липосомальной доставке олигонуклеотидов без модификации. Эти результаты были повторены на суспензионной линии клеток K562 и адгезивной линии клеток SKOV-3.

Методом конфокальной микроскопии было установлено, что триазиныламидофосфатные конъюгаты локализуются в ядре. В то же время немодифицированные олигонуклеотиды образуют несколько плотных флуоресцентных агломератов, что свидетельствует об эндосомальной интернализации этих олигонуклеотидов (рис. 1).

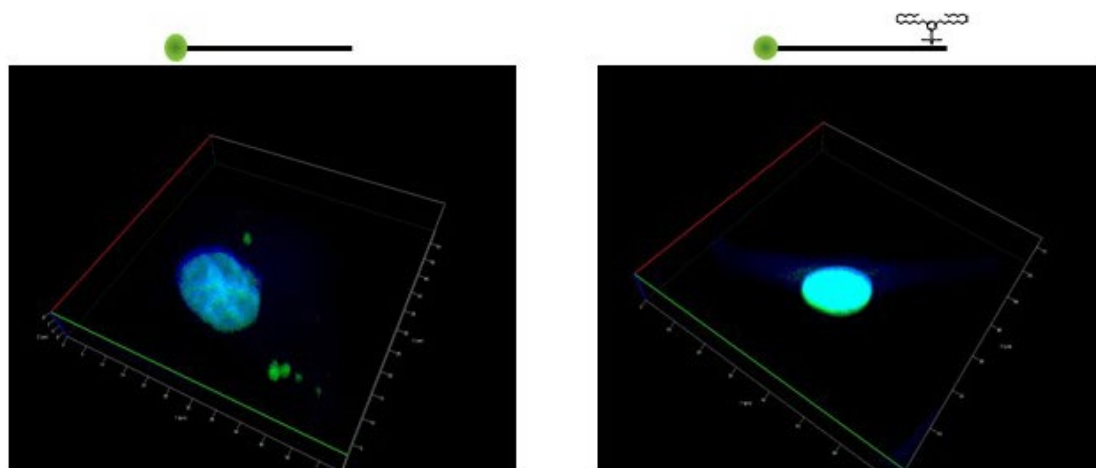


Рис. 1. КЛСМ-изображения клеток, трансфицированных флуоресцентно мечеными олигонуклеотидами. Слева — доставка немодифицированных олигонуклеотидов, справа — триазиныламидофосфатных. Окрашивание DAPI показано синим цветом, FAM-меток — зеленым

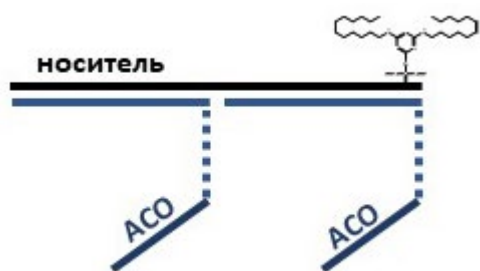


Рис. 2. Схематическое изображение ДНК-конструкции с триазиныламидофосфатом для доставки АСО

После подтверждения того, что триазиныламидофосфат облегчает внутриклеточную доставку одноцепочечных олигонуклеотидов, мы решили проверить возможность доставки более сложных структур. Для этого была создана следующая ДНК-конструкция: два АСО, присоединенные к носителю с триазиныламидофосфатной модификацией через комплементарные цепи с гекса-Т линкерами (рис. 2).

Предполагается, что деградация незащищенного носителя внутри клетки выпустит АСО, обеспечивая их терапевтическую функцию. Следующим шагом будет тестирование данной ДНК-конструкции в клетках.

Литература

1. Morshedi Rad D. et al. A comprehensive review on intracellular delivery // *Advanced Materials*. 2021. Vol. 33, № 13. P. 2005363.
2. Pei D., Buyanova M. Overcoming endosomal entrapment in drug delivery // *Bioconjugate chemistry*. 2018. Vol. 30, № 2. P. 273–283.
3. Springer A. D., Dowdy S. F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics // *Nucleic acid therapeutics*. 2018. Vol. 28, № 3. P. 109–118.
4. Hou X. et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery // *Nature Reviews Materials*. 2021. Vol. 6, № 12. P. 1078–1094.
5. Ohmann A. et al. Controlling aggregation of cholesterol-modified DNA nanostructures // *Nucleic acids research*. 2019. Vol. 47, № 21. P. 11441–11451.
6. Gagliardi M., Ashizawa A. T. The challenges and strategies of antisense oligonucleotide drug delivery // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, № 4. P. 433.
7. Kupryushkin M. S. et al. Triazinylamidophosphate Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction with Cells and DNA-Binding Proteins // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2021. Vol. 47, № 3. P. 719–733.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-119

ТРАНСГЕННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ В ВИРУСОЛОГИИ*

TRANSGENIC CELL LINES IN VIROLOGY

Д. А. Савенкова^{1,2}, Д. А. Алхиреев¹, С. А. Боднев¹, Е. Ю. Прудникова¹, А. В. Зайковская¹,
Ю. А. Головкин¹, И. Р. Иматдинов¹, А. Б. Рыжиков¹, О. В. Пьянков¹, Д. В. Юдкин¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
²Новосибирский государственный университет

D. A. Savenkova^{1,2}, D. A. Alhireenko¹, S. A. Bodnev¹, E. Yu. Prudnikova¹, A. V. Zaikovskaya¹,
Yu. A. Golovko¹, I. R. Imatdinov¹, A. B. Ryzhikov¹, O. V. Pyankov¹, D. V. Yudkin¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo
²Novosibirsk State University

✉ d.savenkova@g.nsu.ru

Аннотация

Клеточные культуры являются классическими вирусологическими моделями. С появлением методов трансгенеза и редактирования генома стало возможным создание трансгенных клеточных линий, которые могут служить более удобными моделями для вирусологических исследований. В данной работе описано получение трансгенных клеточных линий и исследование их восприимчивости к вирусным инфекциям.

Abstract

Cell cultures are used as classic models for virology. Development of transgenesis and genome editing methods leads to a new possibility in creation of transgenic cell lines that can serve as more suitable models for virological research. This work describes the obtaining transgenic cell lines and the study of their susceptibility to viral infections.

Клеточные культуры применяются в широком спектре вирусологических работ, включающих в себя изучение биологических особенностей вирусов, разработку противовирусных препаратов и вакцин, детекцию некоторых вирусных инфекций. Однако не всегда существующие клеточные линии являются оптимальными моделями для исследования конкретного вируса вследствие низкой восприимчивости. С появлением новых методов молекулярной биологии стало возможным изменять специфичность и уровень чувствительности клеточной линии к исследуемому вирусу. Например, одной из стратегий по увеличению восприимчивости клеточных линий к вирусу является увеличение путем трансгенеза количества клеточного рецептора, необходимого для проникновения вируса внутрь клетки-мишени или высвобождения уже новых вирусных частиц из клетки. Другой подход заключается в нокауте белков клеточного антивирусного ответа.

Линии, обладающие повышенной экспрессией рецепторов, получали путем интеграции генетической конструкции, содержащей открытую рамку считывания генов человека *LAMP1*, *TFRC* или *DC-SIGN* под управлением CMV-промотора, с использованием транспозона Sleeping Beauty в геноме клеток линии Vero. Также был определен уровень экспрессии целевых генов для каждой линии. Для оценки эффективности заражения полученных клеточных линий различными вирусами использовали как живые вирусы, так и псевдотипированный лентивирус. Важно отметить, что рецепторы TfR1 и DC-SIGN находятся на мембране клеток и используются некоторыми вирусами для проникновения в клетки. Белок LAMP1 является одним из важнейших белков эндосом, некоторые вирусы используют этот рецептор для раннего выхода из эндоцитарного пути, чтобы избежать протеолитической среды лизосом [1]. Все клетки с повышенной экспрессией указанных выше белков показали повышенную восприимчивость к различным социально значимым инфекциям.

Тетерин — один из важнейших белков, участвующих в клеточном противовирусном ответе. Этот мембранный белок связывает выходящие из клетки вирусные частицы, тем самым снижая вирусную нагрузку. Частичную делецию гена *BST2* осуществляли с использованием системы CRISPR/Cas9, в результате чего происходила потеря N-концевого цитоплазматического (CT) и трансмембранного (TM) доменов в итоговом белке. Таким образом была получена линия Vero-BST2Δ221 [2]. После заражения клеток этой линии вирусами SARS-CoV-1, SARS-

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

© Д. А. Савенкова, Д. А. Алхиреев, С. А. Боднев, Е. Ю. Прудникова, А. В. Зайковская, Ю. А. Головкин, И. Р. Иматдинов, А. Б. Рыжиков, О. В. Пьянков, Д. В. Юдкин, 2023

CoV-2 и вирусами гриппа H5N1 и H5N8 было отмечено уменьшение вирусной нагрузки. Это связано с тем, что полученная делеция не приводила к сдвигу рамки считывания, но из-за отсутствия СТ и ТМ доменов образовывалась растворимая форма белка, которая способна более эффективно связывать вирусные частицы.

Таким образом, показано, что трансгенез обладает значительным потенциалом в создании клеточных линий с различными свойствами для вирусологических исследований, а полученные клеточные линии демонстрируют хорошие результаты при использовании в исследованиях вирусных инфекций.

Литература

1. Дольский А. А., Грищенко И. В., Боднев С. А. и др. Экспрессия белка LAMP1 человека повышает продукцию вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в трансгенных клеточных линиях на основе Vero // Молекулярная биология. 2022. Т. 56 (3). С. 503–509.
2. Dolskiy A. A., Bodnev S. A., Nazarenko A. A. et. al. Deletion of BST2 cytoplasmic and transmembrane N-terminal domains results in SARS-CoV, SARS-CoV-2, and influenza virus production suppression in a Vero cell line // Frontiers in Molecular Biosciences. 2020. Vol. 7. P. 616798.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-120

**ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ АПТАМЕРОВ
С КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ
В ГОМОГЕННЫХ СИСТЕМАХ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ***

**APPLICATION OF APTAMER COMPLEXES WITH COMPLEMENTARY OLIGONUCLEOTIDES
FOR THE DETECTION OF MYCOTOXINS IN HOMOGENEOUS SYSTEMS
WITH FLUORESCENT DETECTION**

А. В. Самохвалов, К. В. Серебrenникова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

A. V. Samokhvalov, K. V. Serebrennikova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev

Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow

✉ 03alexeyssamohvalov09@gmail.com

Аннотация

Работа посвящена применению комплексов аптамеров с комплементарными олигонуклеотидами для анализа пищевых контаминант. Присутствие аналита в пробе приводит к вытеснению олигонуклеотида из комплекса, сопровождающемуся изменением флуоресцентных параметров метки. Установленные закономерности применены для детекции микотоксинов: охратоксина А (предел обнаружения 0,09 нг/мл) и афлатоксина В1 (предел обнаружения 0,05 нг/мл).

Abstract

The work is dedicated to the use of complexes of aptamers with complementary oligonucleotides. In the presence of target the oligonucleotide is displaced from the complex, which is accompanied by a change in the registered fluorescent properties of the label. The obtained regularities were applied for the detection of mycotoxins: ochratoxin A (detection limit was 0.09 ng/mL) and aflatoxin B1 (detection limit was 0.05 ng/mL).

Аптамеры, олигонуклеотидные рецепторные молекулы, интенсивно используются для определения широкого круга соединений. Не уступая антителам по аффинности и селективности, аптамеры имеют ряд преимуществ: простая и легко модифицируемая функциональными группами структура, получение химическим синтезом, высокая стабильность в различных средах и возможность многократной ренатурации. В последнее время активно разрабатываются биоаналитические системы, основанные на применении комплементарных аптамерам коротких одноцепочечных нуклеиновых кислот (оцНК), в частности, на воздействии детектируемого лиганда на образование комплекса аптамер — оцНК. Ранее эти процессы и их зависимость от локализации и протяженности участка взаимодействия с оцНК были описаны нами для G-квадруплексного аптамера, специфичного к охратоксину А (ОТА) [1].

В настоящей работе изучались аналогичные системы с участием дуплексного (шпилечного) аптамера к другому низкомолекулярному токсиканту — афлатоксину В1 (АФВ1) для оценки общности выявленных закономерностей. На основании полученных зависимостей отобраны комплексы оцНК и аптамеров, специфичных к охратоксину А и афлатоксину В1, чувствительные к наличию аналита в пробе. Для регистрации индуцированных аналитом процессов использовали или мечение реагирующих молекул флуоресцеином и тушителем флуоресценции, или введение флуоресцеиновой метки в один из компонентов комплекса, контролируя, соответственно, изменения интенсивности или анизотропии флуоресценции.

Для измерения параметров связывания АФВ1-специфичного аптамера получено производное АФВ1, меченное флуоресцеинтиокарбамил этилендиамином. Константы взаимодействия аптамера с меченым и нативным АФВ1 определяли, регистрируя изменения анизотропии флуоресценции по схеме, ранее предложенной для ОТА-специфичного аптамера [2]. С учетом полученных данных 26-звенный ДНК аптамер 5'-САС-GTG-TTG-TCT-СТС-TGT-GTC-TCG-TG-3' (константа диссоциации комплекса с меченым АФВ1 — 190 ± 60 нМ) и 36-звенный ОТА-специфичный ДНК аптамер 5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-3' (константа диссоциации комплекса с меченым ОТА — 183 ± 14 нМ) были использованы для разработки гомогенных аналитических систем.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-74-01080.

Для обоих аптамеров реализованы системы детекции, основанные на регистрации анизотропии флуоресценции ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ — 490/520 нм). К пробе, содержащей АФВ1/ОТА, последовательно добавляется соответствующая пара меченый олигонуклеотид — аптамер. Реакционная смесь облучается плоскополяризованным светом, и регистрируется анизотропия флуоресценции, величина которой определяется соотношением свободной и связанной форм оцДНК и отражает содержание АФВ1/ОТА в пробе. В выбранных условиях предел обнаружения АФВ1 составляет 45 ± 20 нМ (0,14 нг/мл), ОТА — 22 ± 3 нМ (0,09 нг/мл). Продолжительность тестирования — 5 мин.

Для АФВ1 реализована система, основанная на Ферстеровском переносе энергии флуоресценции (FRET), возникающем при пересечении спектров флуоресценции флуорофора и поглощения тушителя и их сближении. Для аналитического применения этого эффекта 5'-конец аптамера модифицирован флуоресцеином, а 3'-конец комплементарной оцДНК — тушителем RTQ1. Анализ проводится посредством добавления прединкубированного комплекса аптамер — оцДНК к пробам с различной концентрацией АФВ1. Предел обнаружения АФВ1 составляет 15 ± 1 нМ (0,05 нг/мл), продолжительность тестирования — 30 мин.

Важным преимуществом предложенных подходов к выявлению и оценке содержания низкомолекулярных аналитов является простое и быстрое получение результатов.

Литература

1. Samokhvalov A. V., Safenkova I. V., Eremin S. A. et al. Modulation of aptamer–ligand-binding by complementary oligonucleotides: A G-quadruplex anti-ochratoxin A aptamer case study // Intern. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23 (9), № 4876.
2. Samokhvalov A. V., Safenkova I. V., Eremin S. A. et al. Measurement of (aptamer–small target) KD using the competition between fluorescently labeled and unlabeled targets and the detection of fluorescence anisotropy // Anal. Chem. 2018. Vol. 90 (15). P. 9189–9198.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-121

КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННОГО ПОЛИМЕРА ДЛЯ УЛАВЛИВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО***COMPOSITE MATERIALS BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES AND MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR METHYLENE BLUE CAPTURE**

А. Ю. Седельникова, Е. В. Дмитриенко

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

A. Yu. Sedelnikova, E. V. Dmitrienko

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ a.sedelnikova@g.nsu.ru

Аннотация

Был разработан удобный и простой подход для получения гибридного магнитного полимера с молекулярным отпечатком (ММИП) для улавливания красителя МС, который обладает преимуществами молекулярно-импринтированного материала, селективно связывая молекулу-шаблон, и магнитных наночастиц (МНЧ), способствующих проведению магнитного разделения анализируемых веществ и различных загрязняющих компонентов. Благодаря хорошей стабильности, физико-химическим свойствам, высокой адсорбционной способности, специфичности к молекуле-мишени и селективности по отношению к структурным аналогам предлагаемая технология создания ММИП имеет отличные перспективы применения для переработки образцов сточных вод, содержащих МС.

Abstract

A convenient and simple approach has been developed to produce a hybrid molecularly imprinted magnetic polymer (MMIP) for MB dye capture, which has the advantages of molecularly imprinted material, selectively binding the template molecule, and magnetic nanoparticles (MNPs), facilitating the magnetic separation of analytes and various pollutants. Due to good stability, physico-chemical properties, high adsorption capacity, specificity to the target molecule and selectivity towards structural analogs, the proposed technology of MMIP creation has excellent prospects of application for processing wastewater samples containing MB.

Решение проблем экологии — одно из важнейших направлений исследований биотехнологии. Защита окружающей среды и обеспечение безопасности жизнедеятельности людей являются главными целями, которые ставят перед собой ученые, занимающиеся разработками в данной области.

Метиленовый синий (МС) — тиазинный краситель, который благодаря своим фотохимическим свойствам инактивирует бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, а также может быть использован для лечения рака. С другой стороны, МС является важным промышленным красителем и, следовательно, распространенным загрязнителем, который токсичен в высоких концентрациях. Таким образом, МС может использоваться в терапевтических целях, но существует необходимость разработки методов обнаружения и удаления этого красителя из воды в целях безопасности людей.

В данной работе представлен метод получения гибридного молекулярно-импринтированного полимера для улавливания метиленового синего, преимуществами которого являются отсутствие функциональных мономеров или сшивающих агентов и стадии полимеризации, а также простота синтеза. Сформированные в ММИП полости специфически взаимодействуют с анализируемыми молекулами, что доказывается проведенными исследованиями.

Полимерная матрица формировалась при переходе нейлона-6 из растворенного состояния в твердое в присутствии молекул-шаблонов, в качестве которых использовался МС, и наночастиц Fe_3O_4 в исходном растворе. Для оптимизации состава ММИП количество магнитных наночастиц Fe_3O_4 варьировалось от 0,5 до 5 мг на синтез.

Размеры и морфологические характеристики полученных композитов определялись методами динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии и атомной силовой микроскопии. Было выявлено, что полимерный материал представляет собой разветвленные трехмерные структуры со средним диаметром около 200 нм, в который заключены МНЧ.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

© А. Ю. Седельникова, Е. В. Дмитриенко, 2023

Все полученные ММИП обладают достаточными магнитными свойствами для процедуры магнитного разделения: время процесса изменяется от 3 мин для композита с наименьшим содержанием наночастиц Fe_3O_4 до 10 с для полимера, в котором содержание МНЧ максимально.

Различные стадии формирования и изучения ММИП были проанализированы с помощью УФ-видимой спектроскопии. Была определена адсорбционная способность, которая максимальна у композита с наибольшим содержанием железа, составляющая 110 мкмоль/г. Этот параметр растет с увеличением концентрации как для ММИП, так и для МНИП, однако емкость для ММИП значительно выше, что указывает на более высокую эффективность связывания МС. Были получены значения коэффициентов специфичности, которые представляют собой отношение эффективностей связывания МС с ММИП и МНИП. Они составляют $4,9 \pm 0,3$; $4,2 \pm 0,8$ и $5,4 \pm 0,2$ для ММИП с содержанием МНЧ от 0,5 до 5 мг соответственно. Эти результаты подтверждают способность ММИП к распознаванию, которая в 4-5 раз выше, чем у МНИП.

Сродство ММИП и МНИП к МС было проанализировано с помощью линеаризации в координатах Скетчарда. Рассчитанные значения K_d составили $(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ и $(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ М для ММИП и МНИП с содержанием МНЧ 0,5 мг. Для ММИП с содержанием наночастиц Fe_3O_4 2 и 5 мг эти значения составили $(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-7}$ и $(3,1 \pm 0,2) \times 10^{-7}$ М соответственно. Полученные значения указывают на наличие в структурах ММИП высокоаффинных сайтов связывания для специфической адсорбции метиленового синего.

Возможность повторного использования ММИП была исследована при проведении более четырех циклов поглощения и высвобождения МС, в которых наблюдалась практически одинаковая экстракционная способность.

Для доказательства селективности полученных композитных материалов были проведены эксперименты по взаимодействию ММИП со структурными аналогами МС, такими как толуидиновый синий и гидроксизтилфеназин. Количественной характеристикой в данном случае являлись коэффициенты селективности, представляющие собой отношения эффективностей связывания ММИП с МС к каждому из структурных аналогов, которые были оценены как $6,1 \pm 0,6$ и $2,1 \pm 0,3$ для гидроксизтилфеназина и толуидинового синего соответственно. Такая разница в значениях этого параметра между исследуемыми соединениями может быть объяснена более высоким структурным сходством толуидинового синего с метиленовым синим.

Было продемонстрировано, что ММИП также эффективен при взаимодействии с модельными образцами сточных вод, имитирующими реальные ситуации с загрязнителями. Метиленовый синий был растворен в озерной воде, из которой в дальнейшем краситель выделялся с помощью полученных композитных материалов. Эффективность связывания МС была рассчитана как 91 %, что указывает на перспективность применения разработанного материала для очистки сточных вод.

Кроме того, стоит отметить, что полученные композитные материалы стабильны в водном растворе не менее полугода, что можно однозначно отнести к их преимуществам.

Проведенные исследования доказывают высокую эффективность и перспективность полученных магнитных молекулярно-импринтированных полимеров в вопросах сохранения и поддержания экологии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-122

ИММУНОСУПРЕССИЯ КАК НЕБЛАГОПРИЯТНЫЙ ФАКТОР ЛЕТАЛЬНОГО ИСХОДА ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ

IMMUNOSUPPRESSION AS AN ADVERSE FACTOR OF DEATH IN BURN INJURY

П. А. Селиванов

3-й Военный госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, Санкт-Петербург

P.A. Selivanov

3rd Military Hospital of the National Guard of the Russian Federation, Saint Petersburg

✉ olliwoood@gmail.com

Аннотация

Проведен анализ влияния Т-регуляторных (Treg.) лимфоцитов при ожоговой травме (ОТ). Определены значения данного показателя в отношении летальности при ОТ. Уточнены пороговые значения относительного содержания Treg. в пост-травматический период ОТ с целью прогнозирования вероятности наступления летального исхода.

Abstract

The influence of T-regulatory (Treg.) lymphocytes was analyzed in burn injury (BI). The values of this indicator to BI mortality have been determined. The threshold values of the relative concentration of Treg. have been clarified in the post-traumatic period of BI in order to predict the probability of a fatal outcome.

Введение

Ожоговая травма (ОТ) является одной из наиболее часто встречающихся травм среди всех видов поражения кожного локуса, а также одной из наиболее тяжелых проблем, имеющих медико-социальное значение.

В современной комбустиологии летальность среди всех степеней тяжести ОТ составляет 5 %, в то время как при ОТ с критическими и субкритическими по площади ожогами смертность достигает 60 %. Выживаемость при тяжелых ОТ, помимо площади поверхностных и глубоких ожогов, зависит от многих факторов, таких как возраст, вид ожоговой травмы, глубина поражения кожного покрова. Тем не менее, как и при любой патологии, одним из ведущих факторов, определяющих дальнейшее течение болезни при ОТ, является состояние иммунной системы.

Состояние и компетентность иммунной системы определяется в том числе за счет процессов активации и супрессии звеньев общей цепи ответа на патологический процесс. Наряду с гипертрофической реакцией организма при ОТ, служащей механизмом устранения патогенов и аутоантигенов поврежденных тканей, инициируются алгоритмы, направленные на контроль этой реакции, которые в случае выраженной супрессии могут приводить к иммунным дисфункциям вплоть до летального исхода. Одним из представителей клеток с выраженной иммуносупрессорной активностью является субпопуляция Treg., фенотип которой CD4 + CD25^{bright} CD127^{dim-to-neg}.

Материал и методы

В исследование было включено 100 человек. Группа исследования была представлена 65 пациентами с ОТ в возрасте от 18 до 65 лет, имеющих ОТ I-IIIАБ степени тяжести, а группу сравнения составили 35 условно здоровых человек, проходивших ежегодное диспансерное обследование. Критериями исключения в обеих группах стало наличие онкологических заболеваний, тяжелых иммунодефицитных состояний в анамнезе, заболеваний с поражением кожных покровов. Изучение субпопуляции Treg. проводили методом точной цитометрии (Navios, Beckman Coulter, США) в многопараметрическом анализе по безотмывочной технологии на образцах цельной крови, забранной из локтевой вены натощак в утренние часы в вакутейнеры с К2ЭДТА. Панель для идентификации субпопуляции Treg. состояла из следующих моноклональных антител и флуорохромов: CD4-FITC, CD127-PE, CD3-ECD, CD25-PC5.5, CD45-APC750 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2016, пакета Statistica 12.0 (StatSoft, США).

Результаты

Все обследованные с ОТ были разделены на две группы в зависимости от исхода полученной травмы: с летальным исходом ($n = 19$), выжившие после ОТ ($n = 46$). Относительное содержание Treg. в группе сравнения ($n = 35$) было $4,7 \pm 1,1$ %. При оценке наступления летального исхода пациентов было определено, что летальный исход наступает в среднем на $4,3 \pm 1,1$ сутки. При анализе относительного содержания Treg. в группах с различными исходами ОТ было выявлено значимое различие между этими двумя группами. В группе выживших, пострадавших от ОТ, относительное содержание Treg. составляло $9,5 \pm 2,4$ %, в то время как в группе с летальным исходом — $14,2 \pm 1,1$ %. Выявлено статистически значимое увеличение содержания Treg. с иммуносупрессорной активностью в обеих группах пациентов по сравнению с группой сравнения. Более выраженное увеличение этой популяции наблюдали у пациентов с летальным исходом ($p < 0,001$).

Для уточнения порогового значения Treg. в отношении летального исхода после ОТ, был проведен ROC-анализ (88,7 % специфичность, 100 % чувствительность, $p < 0,001$, AUC — 0,938). В отношении прогноза летального исхода у пострадавших с ОТ относительное содержание Treg. не должно превышать 11,6 %. Выраженность нарушений иммунологических показателей клеточного звена иммунитета соответствовала тяжести состояния пациентов. Полученные результаты свидетельствовали о дисбалансе активационной и супрессорной активности иммунной системы у обожженных, что отражало развитие неадекватного иммунного ответа на ОТ у пациентов с летальным исходом.

Заключение

Относительное содержание Treg. в посттравматический период ОТ ниже 11,6 % является благоприятным прогностическим фактором в отношении летальности. Необходимо учитывать степень иммуносупрессии при оценке тяжести последствий ОТ. Включение в алгоритм обследования пострадавших с ОТ относительного содержания регуляторных Т-лимфоцитов способно повысить эффективность терапевтических мероприятий по минимизации вероятности наступления летального исхода.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-123

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛЕНИЯ**DIFFERENTIAL INFLAMMATION TEST SYSTEM DEVELOPMENT**Е. К. Сильванович², А. А. Полякова¹, И. К. Шалик², О. М. Курченко², Б. А. Мальшакова²¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*E. K. Silvanovich², A. A. Polyakova¹, I. K. Shalik², O. M. Kurchenko², B. A. Malshakova²¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*

✉ e.silvanovich@g.nsu.ru

Аннотация

Данная работа нацелена на создание тест-системы на основе аптамеров, способной полуколичественно определить концентрации в слюне таких маркеров воспаления, как С-реактивный белок и Прокальцитонин.

Abstract

This work is aimed at creating a test system based on aptamers that can semiquantitatively determine the concentrations in saliva of such inflammatory markers as C-reactive protein and Procalcitonin.

Биомедицинская диагностика является центральным компонентом современной системы здравоохранения, позволяющим выявлять заболевания на ранней стадии и отслеживать прогресс лечения. Маркеры заболеваний могут быть обнаружены на нескольких различных уровнях, однако реализуемая на данный момент диагностика не мобильна и потому требует много времени. Желательно, чтобы диагностика давала немедленные результаты при минимальном объеме образца неинвазивно, а также дешево. В этом отношении аптасенсоры имеют множество преимуществ, таких как быстрое обнаружение, простота использования, экономичность и легкость массового производства [1], что делает их идеальным выбором для удовлетворения растущих потребностей в биомедицинской диагностике.

В качестве маркера для диагностики природы инфекционного агента у пациентов наиболее перспективными являются С-реактивный белок (СРБ) и Прокальцитонин (ПКТ). СРБ является признанным биомаркером присутствия инфекции и широко используются в больницах стран с высоким уровнем дохода [2].

В некоторых странах тесты СРБ также регулярно используются у пациентов с респираторными симптомами, что позволило безопасно и экономически эффективно снизить использование антибиотиков [3].

ПКТ является основным дифференцирующим маркером, позволяющим определить характер заболевания. При бактериальной инфекции концентрация прокальцитонина стремительно растет (как в случае с С-реактивным белком), но, если человек инфицирован вирусом, то повышения концентрации прокальцитонина не наблюдается [4].

Целью данной работы является создание быстрого теста на определение СРБ и ПКТ в слюне при помощи аптасенсоров. Для этого были поставлены следующие задачи: сборка флуориметра, синтез системы аптасенсора, проведение клинического эксперимента на определение корреляции концентраций маркеров между кровью и слюной.

Аптамеры были подобраны на основе литературы [5, 6] и содержали флуоресцентную метку на 5'-конце. Также были подобраны комплементарные олигонуклеотиды, которые содержали тушитель метки на 3'-конце. Флуоресцентный сигнал измеряли при помощи флуориметра, разработанного при работе с ИЛФ СО РАН.

Целью клинического эксперимента было определение факта повышения концентрации СРБ и ПКТ в слюне при их повышении в крови, а также определение зависимости концентраций. Были выбраны три группы пациентов: контроль (здоровые люди), пациенты с бактериальной инфекцией [7], пациенты с вирусной инфекцией [7]. Его проведение включало в себя следующие этапы: разработка протокола исследования, работа с медицинскими учреждениями Новосибирска, проведение ИФА по протоколу.

Результаты данной работы позволяют продвинуться в области диагностики на основе аптамеров — аналогов антител, использование которых сделает контроль и пресечение распространения эпидемий более эффективным [8].

Литература

1. BasePair. URL: <https://www.basepairbio.com/aptamers-vs-antibodies/>.
2. Tari I. et al. Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2004. Vol. 26. Suppl. 3.
3. Oppong R. et al. Cost-effectiveness of point-of-care C-reactive protein testing to inform antibiotic prescribing decisions // *British Journal of General Practice*. 2013. Vol. 63, № 612. P. e465–e471.
4. Cleland D., Eranki A. Procalcitonin // *StatPearls*. 2023.
5. Centi S. et al. Detection of C Reactive Protein (CRP) in Serum by an Electrochemical Aptamer-Based Sandwich Assay // *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. 2009. Vol. 21, № 11. P. 1309–1315.
6. Pidal J. M. G. et al. OFF-ON on-the-fly aptassay for rapid and accurate determination of procalcitonin in very low birth weight infants with sepsis suspicion // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023. Vol. 378. P. 133107.
7. Вайсман Д. Ш. Руководство по использованию Международной классификации болезней в практике врача. 2013.
8. Jayasena S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics // *Clinical chemistry*. 1999. Vol. 45, № 9. P. 1628–1650.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-124

**НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОЙ ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ДОБАВКИ
НА ОСНОВЕ ВЫРАЩИВАНИЯ НАЗЕМНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ СИБИРИ В УСЛОВИЯХ КФХ*****NEW METHOD OF PROTEIN FOOD AND FEED PRODUCTS GENERATION
ON THE BASIS OF TERRESTRIAL INVERTEBRATES RAISED IN FARM**

К. Е. Скрипцова, С. Э. Чернышев, И. Б. Бабкина, Р. Т-о. Багиров,
В. П. Модяева, М. Д. Морозова, Е. Ю. Субботина, М. В. Щербаков, А. В. Симакова

Томский государственный университет

K. E. Skriptcova, S. E. Tshernyshev, I. B. Babkina, R. T-o Baghirov.,
V. P. Modyaeva, M. D. Morozova, E. Yu. Subbotina, M. V. Shcherbakov, A. V. Simakova

Tomsk State University

✉ ksu.skriptcova@mail.ru

Аннотация

Предлагается метод получения биомассы наземных беспозвоночных Сибири. Два вида ксилосапрофагов (бронзовка *Cetonia aurata viridiventrис* и жук-носорог *Oryctes nasicornis*) содержались на целлюлозосодержащих субстратах, обогащенных прекурсорами питательных веществ. Нутриентный анализ личинок выявил высокое содержание белка, жира, углеводов, витаминов и минералов с повышенным содержанием магния и фосфора.

Abstract

A method for producing biomass of terrestrial invertebrates of Siberia is proposed. Two species of xylosaprophages beetle species (green rose chafer *Cetonia aurata viridiventrис* and the European rhinoceros beetle *Oryctes nasicornis*) were contained on cellulose-rich feed substrates enriched with precursor material. Biochemical analysis of the larvae showed a high content of protein, fat, carbohydrates, vitamins and minerals with the highest content of magnesium and phosphorus.

Интерес к производству продукции из наземных беспозвоночных в настоящее время растет [1–5], наряду с зарубежными компаниями-производителями существуют компании, развивающиеся в России, такие как Энтопротех, Зоопротеин, Инагробио [6]. Появляются небольшие производства, например T-RexFood. В качестве источника пищевого белка отбираются апробированные тропические виды насекомых: *Locusta migratoria* Linnaeus, 1758 (саранча), *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (хлебный хрущ), *Acheta domesticus* (домашний сверчок) и *Alphitobius diaperinus* (малый мучной хрущак), которые допущены правилами ЕС в качестве источника пищевого протеина [7–10]. Несмотря на быстрое развитие, эти виды представляют сложность для выращивания в крестьянско-фермерских хозяйствах (КФХ) Сибири: требуется соблюдение высоких температур, освещенности и специальной подготовки кормов.

В России развиты лесоперерабатывающая и сельскохозяйственная отрасли. Каждый год от этих отраслей большие объемы отходов, содержащих целлюлозу, лигнин, гемицеллюлозу и сопутствующие вещества. В Сибири существуют виды насекомых, развивающихся на подобных остатках в природе, такие как бронзовка *Cetonia aurata viridiventrис* (Reitter, 1896), развивающаяся в разлагающихся остатках древесины и травянистой растительности, и жук-носорог *Oryctes nasicornis* (Linnaeus, 1758), развивающийся в преющей древесине. Они были выбраны для создания экспериментальной линии по производству животного белка [5].

Биохимические исследования личинок этих видов показали (далее первыми цитируются данные по бронзовкам, вторыми — по носорогам) высокое содержание белка (20,8 % и 25,9 %), присутствие углеводов (0,27 % и 0,23 %) и жира (0,44 % и 0,14 %) при невысокой общей калорийности 99 % и 96 %. Биомасса оказалась богата фосфором (450 мг/100 г и 400 мг/100 г) и магнием (288 мг/100 г и 251 мг/100 г) и содержит Fe, Se, Zn, Mo, Mn, Cu в заметных количествах. Из витаминов выявлено содержание B1 (2,5 мг/100 г и 3,4 мг/100 г), B2 (5,5 мг/100 г и 7,1 мг/100 г), E (0,59 мг/100 г и 0,74 мг/100 г) и A (0,0337 мг/100 г и 0,0414 мг/100 г). Таким образом, биомассу личинок данных видов можно характеризовать как насыщенную питательными веществами.

* Работа выполнена при поддержке гранта № 075-15-2022-1152.

Экспериментальная линия по выращиванию модельных видов состоит из единой схемы и включает: репродуктор (breeder) для содержания имаго и кладки яиц, инкубатор яиц (incubator), культиватор личинок (larvae reager), инкубатор куколок (pupae reager). В качестве субстрата для личинок обоих видов используются ферментированные опилки, у бронзовок в смеси с растительными остатками. Пищевой субстрат насыщен прекурсорами нутриентов для увеличения их концентрации в биомассе личинок. Средние температуры содержания составляют около +15 °С, освещение необходимо стадии имаго, средняя влажность субстрата личинок ~ 70 %.

Подробная схема выращивания с условиями содержания, рецептурой питательных субстратов и затратами КФХ на организацию линии будет изложена в готовящейся статье.

Литература

1. Van Huis A. et al. Edible insects: future prospects for food and feed security // Food and agriculture organization of the United Nations. 2013. Vol. 171.
2. Zielicka E. et al. Selected species of edible insects as a source of nutrient composition // Food Research International. 2015. Vol. 77. P. 460–466.
3. Oonincx D., Finke M.D. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition // Journal of Insects as Food and Feed. 2021. Vol. 7 (5). P. 639–659.
4. Shah A.A. et al. Nutritional composition of various insects and potential uses as alternative protein sources in animal diets // Animal Bioscience. 2022. Vol. 35 (2). P. 317.
5. Tshernyshev S.E. et al. Invertebrates of Siberia, a potential source of animal protein for innovative food production. 1. The keelback slugs (Gastropoda: Limacidae) // Acta Biologica Sibirica. 2022. Vol. 8. P. 749–762.
6. Gorbunova N.A., Zakharov A. N. Edible insects as a source of alternative protein. A review // Theory and practice of meat processing. 2021. Vol. 6. P. 23–32.
7. EFSA Scientific Committee. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed // EFSA Journal. 2015. Vol. 13 (10). P. 4257.
8. Lahteenmaki-Uutela A., Grmelova N. European law on insects in food and feed // Eur Food Feed Law Review. 2016. Vol. 11. P. 2–8.
9. Van Peer M. et al. Potential of Using Organic Side Streams as Feed for *Tenebrio molitor*, *Acheta domesticus* and *Locusta migratoria* // Insects. 2021. Vol. 12. P. 796.
10. Turck D. et al. Safety of frozen and freeze and dried formulations of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* larva) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 // EFSA Journal. 2022. Vol. 20 (7). P. 7325.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-125

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО RBD ГЛИКОПРОТЕИНА SPIKE ВИРУСА SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ

PRODUCTION OF RECOMBINANT RBD GLYCOPROTEIN SPIKE OF THE SARS-COV-2 VIRUS IN MAMMALIAN AND METHYLOTROPHIC YEAST CELLS

А. А. Снегирева, Е. Ю. Прудникова, Д. И. Ивкина, И. Р. Иматдинов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

A. A. Snegireva, E. Yu. Prudnikova, D. I. Ivkina, I. R. Imatdinov

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ kozlovskaya_aa@vector.nsc.ru

Аннотация

Данная работа посвящена получению гомогенного рекомбинантного рецептор-связывающего домена гликопротеина Spike двух вариантов вируса SARS-CoV-2 (Delta B.1.617.2, Omicron B.1.1.529) для изучения комплексов антиген — антитело с иммуноглобулинами реконвалесцентов COVID-19.

Abstract

This work is devoted to obtaining a homogeneous recombinant receptor-binding domain of the Spike glycoprotein of two variants of the SARS-CoV-2 virus (Delta B.1.617.2, Omicron B.1.1.529) for the study of antigen — antibody complexes with immunoglobulins of COVID-19 reconvalescents.

Продукция рекомбинантных коронавируса антигенов в их нативной конформации возможна в клеточных системах экспрессии как высших, так и низших эукариот, с использованием генно-инженерных технологий и с полным соблюдением требований биобезопасности [1, 2].

Показано, что при транзientной экспрессии в клетках млекопитающих синтезируются гликопротеины с комплексным ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) и гибридным ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$) профилями N-гликозилирования, подобная гетерогенность может осложнить последующую кристаллизацию белков и получение однородных кристаллов. В то же время для представителей класса *Saccharomyces* характерны N-связанные высокоманнозные гликаны ($\text{Man}_{9,\dots,100}$), что также может оказать негативное влияние на формирование однородных монокристаллов [3, 4].

Разрешение структуры комплексов антиген — антитело высокоспецифических и широконейтрализующих иммуноглобулинов, нацеленных на ключевые антигенные детерминанты вирусов, позволяет получить новые знания фундаментального и прикладного характера. В частности, определение особенностей взаимодействия моноклональных антител реконвалесцентов COVID-19 с рекомбинантными хроматографически очищенными препаратами RBD двух актуальных вариантов коронавируса SARS-CoV-2 (Delta B.1.617.2, Omicron B.1.1.529), позволяет углубить знания в области формирования протективного гуморального иммунного ответа и вплотную подойти к рациональной модификации легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов с целью улучшения свойств антител (аффинность, авидность и т. д.).

Для успешной кристаллизации комплексов антиген — антитело требуются препаративные количества биополимеров с высокой степенью чистоты и однородности. В связи с этим проведено сопоставление свойств рекомбинантных антигенов, полученных при транзientной экспрессии в клетках млекопитающих и в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*). Для продукции RBD в клетках HEK293 использован ранее разработанный протокол временной экспрессии с применением генетических конструкций pCAG_RBD (B.1.617.2) и pCAG_RBD (B.1.1.529). После хроматографической очистки RBD_HEK293 анализировали методами SDS PAGE, ТФ ИФА и вестерн-блоттинг.

Для получения продуцентов на основе метилотрофных дрожжей *K. phaffii* использованы интеграционные конструкции PpStem, кодирующие гены RBD вариантов Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) под контролем индуцибельных промоторов. В первом варианте в составе конструкции трансген с сигналом секреции альфа фактора фланкирован сильным индуцибельным промотором AOX1 и терминатором транскрипции AOX1. Во втором варианте химерный ген RBD с сигналом секреции альфа-фактора находится под контролем промотора алкоголь-дегидрогеназы 2 (ADH2).

Клонирование генов RBD (B.1.617.2) и RBD (B.1.1.529) в векторы PpStem_AOX1 и PpStem_ADH2 производили по уникальным сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI и XhoI. Корректность нуклеотидных последовательностей рекомбинантных плазмид подтверждали секвенированием по методу Сэнгера. После линейаризации рекомбинантных конструкций PpStem проведена электропорация компетентных клеток *K. phaffii*, с последующим высевом на агаризованную среду YPD с G-418 (1 мг/мл) с целью селекции клонов-трансформантов.

Для отбора высокопродуктивных клонов проводили анализ секреции RBD в кондиционированную среду. Для этого единичные колонии переносили в 2 мл дрожжевой среды (YPD) и культивировали при 30 ± 1 °C и 180 rpm в течение 24–36 ч, после чего биомассу дрожжей переносили в минимальную синтетическую среду с добавлением индуктора экспрессии (метанол/этанол) до концентрации 1 % от объема питательной среды каждые 24 ч в течение 120 ч. Культивирование клонов-трансформантов, секретирующих рекомбинантные белки, проводили при температурных режимах 25 ± 1 °C, 28 ± 1 °C, 30 ± 1 °C. Анализ секретируемых рекомбинантных белков проводили методом дот-блоттинга с использованием AF488-меченных моноклональных антител к RBD SARS-CoV-2. В результате скрининговых исследований отобраны клоны-продуценты, а также определены условия культивирования и индукции экспрессии вирусных антигенов в клетках *K. Phaffii*.

Выделение рекомбинантных белков RBD (B.1.617.2) и RBD (B.1.1.529) из кондиционированных сред проводили методом металлхелатной аффинной хроматографии в нативных условиях. Белковые фракции анализировали методами SDS PAGE и вестерн-блоттинг. Показано, что рекомбинантные белки, полученные в клетках *K. Phaffii*, проявляют сопоставимые физико-химические и антигенные свойства относительно RBD_HEK293.

Литература

1. Rigüero V., Delmar J., Dippel A. A scalable and high yielding SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain production process // Protein Expression and Purification. 2023. Vol. 205. 106241.
2. Limonta-Fernández M. et al. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen // New Biotechnology. 2022. Vol. 72. P. 11–21.
3. Wang L.-X., Lomino J. V. Emerging technologies for making glycan-defined glycoproteins // ACS chemical biology. 2012. Vol. 7 (1). P. 110–122.
4. Choi B.-K. et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. P. 5022–5027.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-126

СПОСОБ ПЕРМАНЕНТНОГО УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОКАТАЛИЗАТОРОВ**METHOD OF NUCLEIC ACIDS IMPURITY PERMANENT REMOVAL FROM THE MATERIAL SURFACE USING PHOTOCATALYSTS**М. И. Соловьева^{1,2}, Д. С. Селищев^{1,2}, Е. С. Журавлев³, Г. А. Степанов³, В. А. Рихтер³, Д. В. Козлов^{1,2}¹Новосибирский государственный университет²Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, НовосибирскM. I. Solovyeva^{1,2}, D. S. Selishchev^{1,2}, E. S. Zhuravlev³, G. A. Stepanov³, V. A. Richter³, D. V. Kozlov^{1,2}¹Novosibirsk State University²Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Novosibirsk³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ smi@catalysis.ru

Аннотация

Фотоактивное покрытие на основе диоксида титана на поверхности материалов позволяет эффективно удалять нуклеиновые кислоты под действием света, причем чем длиннее молекула, тем быстрее происходит ее удаление. С использованием метода ПЦР и ферментов репарации показано, что снижение количества ДНК обусловлено окислением азотистых оснований и накоплением одноцепочечных и двуцепочечных разрывов.

Abstract

A photoactive coating based on titanium dioxide on the material surface allows to effectively remove nucleic acids under light. There is a tendency that the longer the molecule, the faster its removal occurs. Using the PCR method and repair enzymes, it was shown that the DNA amount decrease is due to the oxidation of nitrogenous bases and the single-stranded and double-stranded breaks accumulation.

Присутствие в воздухе и на поверхности лабораторного оборудования нуклеиновых кислот, таких как ДНК и РНК, в составе микроорганизмов или в свободном виде может вызывать загрязнение реагентов или анализируемых образцов. Такое загрязнение будет значительным для микробиологических исследований. Например, при анализе наличия возбудителя в пробе с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) присутствие примесных молекул ДНК может привести к возникновению ложноположительных результатов тестирования, поэтому необходимо удалять нуклеиновые кислоты из окружающей среды.

Одним из перспективных путей перманентной борьбы с такими загрязнителями является получение самоочищающихся материалов путем модифицирования их поверхности фотокатализаторами, например диоксидом титана (TiO₂) [1]. Такие материалы под действием света полностью окисляют химические соединения, а также способствуют гибели бактерий и вирусов, разрушая их структуры вплоть до генетической информации [2]. Поэтому данные материалы перспективны для удаления нуклеиновых кислот в лабораторных помещениях.

Для нанесения фотоактивного покрытия на поверхность материалов был разработан состав на основе спиртовой суспензии нанокристаллического диоксида титана и связующего, который представляет собой смесь олигоэтоксисилоксанов [3]. Варьирование количества и соотношения компонентов состава позволило получить устойчивые к трению фотоактивные покрытия на поверхности как пористых (стеклоткань, хлопковая ткань), так и непористых (стекло, металл, пластик) материалов, способные полностью окислять пары летучих органических соединений (ЛОС) под действием света.

Возможность удаления нуклеиновых кислот с поверхности таких самоочищающихся материалов была изучена с помощью метода ПЦР. Было показано, что увеличение времени воздействия светом или количества диоксида титана в составе покрытия способствовало снижению количества ДНК на поверхности материала с фотоактивным покрытием вплоть до предела обнаружения, в то время как на исходном материале молекулы оставались стабильными. Кроме того, с использованием смеси фрагментов ДНК длиной 71–454 пары нуклеотидов было установлено, что с увеличением длины исходного фрагмента ДНК ее деструкция происходит быстрее и эф-

фективнее, что связано с увеличением вероятности воздействия фотогенерированных окислителей с молекулой большей длины.

С использованием ферментов, способных восстанавливать правильную структуру молекулы ДНК, были изучены причины снижения количества нуклеиновых кислот на поверхности TiO_2 -содержащих материалов. Так, обработка лигазой ДНК после воздействия УФ-излучения на поверхность самоочищающихся материалов доказала возникновение одноцепочечных разрывов в структуре молекулы. С использованием комплекса ферментов репарации было показано возникновение изменений в составе азотистых оснований. Стоит отметить, что ни один фермент не увеличил количество ДНК после осветления образцов до начального, что означает появление более сложных изменений, например двуцепочечных разрывов. Таким образом, уменьшение количества ДНК обусловлено окислением азотистых оснований и накоплением одноцепочечных и двуцепочечных разрывов.

Это показывает перспективность использования предложенного подхода для перманентного удаления примесных нуклеиновых кислот внутри помещений и снижения рисков возникновения ложноположительных результатов при проведении исследований.

Литература

1. Solovyeva M., Selishchev D., Cherepanova S. et al. Self-Cleaning Photoactive Cotton Fabric Modified with Nanocrystalline TiO_2 for Efficient Degradation of Volatile Organic Compounds and DNA Contaminants // *Chemical Engineering Journal*. 2020. Vol. 388. P. 124167.
2. Selishchev D., Stepanov G., Sergeeva M. et al. Inactivation and Degradation of Influenza A Virus on the Surface of Photoactive Self-Cleaning Cotton Fabric Functionalized with Nanocrystalline TiO_2 // *Catalysts*. 2022. Vol. 12, № 11. P. 1298.
3. Патент № 2022123949. Российская Федерация. 09.09.2022.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-127

**ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ЛАМЫ,
НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ SARS-COV-2*****SINGLE DOMAIN LLAMA ANTIBODIES BROADLY NEUTRALIZING SARS-COV-2 VARIANTS**

П. П. Солодков, Т. Н. Беловежец, А. Н. Чикаев, К. О. Баранов, С. В. Кулемзин, А. А. Горчаков,
С. В. Гусельников, Л. В. Мечетина, А. М. Наякшин, О. Ю. Волкова, Н. А. Чикаев, А. В. Таранин

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

P. P. Solodkov, T. N. Belovezhets, A. N. Chikaev, K. O. Baranov, S. V. Kulemzin, A. A. Gorchakov,
S. V. Guselnikov, L. V. Mechetina, A. M. Nayakshin, O. Yu. Volkova, N. A. Chikaev, A. V. Taranin

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

✉ solodkov.pavel@mcb.nsc.ru

Аннотация

Особенностью позднего этапа пандемии COVID-19 стало распространение мутантных вариантов SARS-CoV-2, устойчивых к иммунному ответу против уханьского вируса. В данной работе мы сообщаем о получении панели противовирусных агентов — однодоменных антител, распознающих независимые эпитопы S-белка SARS-CoV-2. Четыре антитела из этой панели нейтрализуют широкий спектр вариантов вируса, включая наиболее распространенные на текущий момент: XBB.1.5 и XBB.1.16.

Abstract

The late stage of the COVID-19 pandemic is marked by the appearance of mutant variants of SARS-CoV-2 that can escape the immunity against the Wuhan virus. In this work, we report on the development of a panel of antiviral agents — single-domain antibodies that recognize independent epitopes of the SARS-CoV-2 S protein. Four antibodies from this panel neutralize a wide range of virus variants, including the most common ones at present: XBB.1.5 and XBB.1.16.

Несмотря на завершение коронавирусной пандемии, вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в популяциях различных стран мира. По-прежнему сохраняется необходимость в эффективных средствах терапии для представителей групп риска, таких как престарелые и иммунодефицитные пациенты. Рекомбинантные моноклональные антитела, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2, стали одним из важнейших средств противодействия коронавирусной инфекции для этих групп. Начиная с ноября 2020 г. целый ряд противовирусных препаратов на основе антител получил разрешение для экстренного применения. Однако в настоящее время использование этих препаратов сильно скомпрометировано появлением и распространением новых вариантов вируса, способных избегать иммунный ответ, вызванный исходным уханьским вариантом SARS-CoV-2. Например, варианты сублинии XBB, распространившиеся в 2023 г., резистентны ко всем получившим разрешение терапевтическим противовирусным антителам. Более того, из тысяч охарактеризованных с начала пандемии моноклональных антител против SARS-CoV-2 только несколько оказались способными нейтрализовать BQ и XBB варианты вируса.

В лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН получены первые в России моноклональные антитела человека, нейтрализующие наиболее актуальные варианты SARS-CoV-2. В качестве альтернативного направления мы изучаем возможность создания противовирусных препаратов на основе однодоменных антител ламы. Однодоменные антитела (VНН) представляют собой вариабельные домены особого класса антител, состоящих только из тяжелых цепей и встречающихся только у представителей семейства верблюдовых. VНН обладают рядом преимуществ, среди которых небольшой размер (15 кДа), стабильность и удобство мультимеризации. В силу своего небольшого размера VНН могут связывать эпитопы, недоступные классическим антителам, что особенно интересно с точки зрения поиска консервативных областей уязвимости вирусов.

В 2020 г. с использованием скрининга по технологии фагового дисплея нами были получены VНН к RBD SARS-CoV-2. Олигомерные формы этих VНН высокоэффективно нейтрализовали ранние варианты вируса SARS-CoV-2, но оказались неэффективными по отношению к вариантам линии омикрон. С целью поиска нейтрализующих VНН широкого спектра действия мы провели иммунизацию ламы RBD нескольких вариантов SARS-CoV-2,

* Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2021-1086.

© П. П. Солодков, Т. Н. Беловежец, А. Н. Чикаев, К. О. Баранов, С. В. Кулемзин, А. А. Горчаков, С. В. Гусельников, Л. В. Мечетина, А. М. Наякшин, О. Ю. Волкова, Н. А. Чикаев, А. В. Таранин, 2023

включая омикрон BA.4/5. Фаговую библиотеку, сконструированную на основе иммунного репертуара ламы, последовательно скринировали на наличие VHH, связывающих варианты BQ.1.1 и XBB1.5. Полученную суббиблиотеку дополнительно обогащали клонами, вытесняющими клеточный рецептор коронавируса ACE2 из комплекса с RBD. В результате были идентифицированы и наработаны 6 уникальных однодоменных антител. Из них 4 оказались способными эффективно нейтрализовать лентивирусы, псевдотипированные S-белками уханьского штамма и вариантов омикрон BA.4/5, BQ.1.1, XBB.1, XBB.1.5 и XBB.1.16. Значения KD связывания полученных VHH с RBD уханьского варианта, измеренные с использованием биослойной интерферометрии, находятся в пиколярном диапазоне. Анализ конкурентного связывания показал, что каждое из четырех широко нейтрализующих однодоменных антител связывает независимый эпитоп. Этот факт представляет особый интерес с точки зрения возможностей создания терапевтических и профилактических средств, способных эффективно противостоять мутационному ускользанию SARS-CoV-2.

Таким образом, нами были получены высокоаффинные однодоменные антитела ламы, нейтрализующие широкий спектр вариантов SARS-CoV-2 и отличающиеся разной специфичностью. В дальнейшем эти VHH будут использованы для конструирования мультивалентных и мультиспецифичных рекомбинантных белков, отличающихся уникальными противовирусными свойствами.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-128

**ПОИСК НОВЫХ ГЛЮТЕНАЗ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.
И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ****IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)
GLUTENASES**А. Д. Солонкина^{1,2}, А. А. Сахаров¹, О. Е. Чепикова^{1,2}, Н. В. Гороховец¹, А. В. Головин^{2,3}, А. А. Замятнин-мл.¹⁻⁴¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова²Научно-технологический университет «Сириус», Сочи³Факультет биоинженерии и биоинформатики,

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

⁴Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МоскваA. D. Solonkina^{1,2}, A. A. Sakharov¹, O. E. Chepikova^{1,2}, N. V. Gorokhovets¹, A. V. Golovin^{2,3}, A. A. Zamyatnin Jr¹⁻⁴¹Sechenov First Moscow State Medical University²Sirius University of Science and Technology, Sochi³Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University⁴Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow

✉ alene.s@mail.ru

Аннотация

Одним из потенциальных способов улучшения качества жизни людей с целиакией может быть применение протеиназ, расщепляющих иммуногенные компоненты глютена, — глютеназ. Целью исследования является поиск и изучение биохимических свойств глютеназ пшеницы *Triticum aestivum* L. Показано, что идентифицированные протеиназы активируются при 37 °С в растворах с рН 2,6–7,5, а также способны расщеплять глютен в кислых рН.

Abstract

Proteases that cleave immunogenic peptides of gluten, glutenases, can be used to improve the quality of life of celiac disease patients. The aim of this work was the search for new wheat glutenases and the study of their biochemical properties. We have studied autocatalytical activation and glutenase activity of two bacterially expressed wheat proteases.

В настоящее время активно исследуется применение ферментов для лечения заболеваний [1], в частности, целиакии — аутоиммунного заболевания, симптомы которого обусловлены воспалительными реакциями на продукты расщепления глютена в кишечнике. В состав глютена главным образом входят проламиновые белки: глиадины и глютенины. Продукты расщепления глиадина включают 25-мерный и 33-мерный пептиды. Эти фрагменты обладают иммуногенными и токсическими свойствами и способствуют развитию симптомов заболевания [2]. Известно несколько протеиназ, способных расщеплять глютен на короткие пептиды, то есть обладающих глютеназной активностью [3, 4]. В частности, цистеиновая протеиназа пшеницы *T. aestivum* L. тритикаин- α расщепляет глютен в среде, имитирующей условия желудочно-кишечного тракта [3].

Цели исследования — поиск ферментов пшеницы, способных расщеплять глютен эффективнее, чем тритикаин- α , клонирование нуклеотидных последовательностей этих ферментов и исследование биохимических свойств полученных белков.

Поиск протеиназ, потенциально способных к расщеплению глютена, осуществляли с использованием биоинформатических методов. Первым этапом было гомологичное моделирование структур последовательностей, схожих с цистеиновыми протеиназами пшеницы, а затем происходила оценка их сродства к субстратам PLVQ-X, RQPQ-X, VLPQ-X, X = LPYP. По результатам докинга выбрали 2 протеиназы с Uniprot-идентификаторами A0A3B6JDP7 (далее — Та-Р7) и A0A3B6B7V6 (далее — Та-V6). Эти ферменты имеют наибольшую энергию связывания с указанными выше лигандами, а расстояние от карбонильного атома 4-го аминокислотного остатка в пептиде до атома серы в остатке цистеина в активных центрах протеиназ минимально.

Поскольку глютен является запасаящим веществом в зернах пшеницы [1], вероятно, расщепляющие его ферменты экспрессируются на ранних стадиях развития растения. На третий день от прорастания семян пшеницы *T. aestivum* L. выделяли тотальную РНК из стеблей и корней, затем методом ПЦР с обратной транскрипцией

с использованием специфических праймеров синтезировали кДНК Та-Р7 и Та-V6. В качестве вектора для клонирования использовали плазмиду рЕТ28/22. Последовательности, кодирующие белки, каждую отдельно, помещали в вектор по сайтам *EcoRI* и *NheI*. Оба белка содержали 6 гистидиновых остатков на N-конце.

Выделение Та-Р7 и Та-V6 проводили из лизата клеток методом аффинной хроматографии в нативных условиях с последующей очисткой методом гель-фильтрации. Способность белков образовывать активированную форму изучали в буферных растворах с рН 2,6–7,5 при 37 °С. Для Та-V6 также изучали способность к активации в аналогичных условиях в растворах с добавлением 1 мМ ЭДТА и 5 мМ ДТТ. Реакцию ферментативного расщепления глютена проводили при тех же условиях, что и активацию, в течение 4 ч.

В ходе исследования впервые были клонированы последовательности, кодирующие белки Та-Р7 и Та-V6. Белки получены в растворимой форме в бактериальной системе экспрессии. Та-Р7 обладает аутокаталитическими свойствами — при его активации отщепляется про-домен, в результате чего белок становится каталитически активным. Было обнаружено, что Та-Р7 активируется при значениях рН ниже 5,6, причем скорость активации увеличивается при понижении рН. Та-V6 активируется в растворах, содержащих ДТТ и ЭДТА, в слабокислой среде с постепенным отщеплением про-домена. Также изучена глютенная активность этих протеиназ.

Литература

1. Wei G., Helmerhorst E. J., Darwish G. et al. Gluten Degrading Enzymes for Treatment of Celiac Disease // *Nutrients*. 2020. Vol. 12 (7). P. 2095.
2. Balakireva A. V., Zamyatnin A. A. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities // *Nutrients*. 2016. Vol. 8 (10). P. 644.
3. Savvateeva L. V., Gorokhovets N. V., Makarov V. A. et al. Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Trit-icain- α : Feasibility for enzymatic therapy assays // *The international journal of biochemistry & Cell biology*. 2015. Vol. 62. P. 115–124.
4. Bethune M. T., Strop P., Tang Y. et al. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease // *Chemistry & Biology*. 2006. Vol. 13 (6). P. 637–647.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-129

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
НА БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ*****THE EFFECT OF OXIDATIVE STRESS
ON THE BACTERIA-DESTRUCTORS OF PETROLEUM HYDROCARBONS**

В. В. Суворова, И. А. Нечаева

*Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии,
Тульский государственный университет*

V. V. Suvorova, I. A. Nechaeva

Laboratory of Environmental and Medical Biotechnology, Tula State University

✉ suvorova.victoria.2010@mail.ru

Аннотация

В ходе проведенных экспериментов показано, что актинобактерии рода *Rhodococcus* способны расти на труднодоступных субстратах вне зависимости от его агрегатного состояния. При добавлении в среду инкубации окислителей активность антиоксидантных ферментов возрастает, так как образуется больше АФК. Штамм *R. erythropolis* S67 имеет значительно высокие значения активностей антиоксидантных ферментов, что делает его более стабильным в присутствии окислителей.

Abstract

During the experiments conducted, it was shown that actinobacteria of the genus *Rhodococcus* are able to grow on hard-to-reach substrates regardless of its aggregate state. When oxidants are added to the incubation medium, the activity of antioxidant enzymes increases, as more ROS are formed. The strain *R. erythropolis* S67 has significantly high values of antioxidant enzyme activity, which makes it more stable in the presence of oxidants.

Аэробным организмам требуются молекулы кислорода для синтеза АТФ посредством окислительного дыхания. Однако аэробное дыхание генерирует активные формы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов, главным образом через флавопротеины, которые вступают в реакцию непосредственно с кислородом с образованием супероксида (O_2^-) или перекиси водорода (H_2O_2). Известно, что эти токсичные молекулы кислорода вызывают функциональное и структурное повреждение клеточных компонентов, что может привести к гибели клеток. Таким образом, клетки содержат различные защитные механизмы для детоксикации любых неблагоприятных эффектов, вызванных накоплением АФК. Снижение их уровня в клетке обеспечивают ферменты антиоксидантной защиты. Штаммы *Rhodococcus* spp. обладают метаболической универсальностью и устойчивостью в окружающей среде, благодаря чему играют важную роль в биоремедиации, биотрансформации и биокатализе, активно применяются для производства соединений, имеющих экологическое, промышленное и медицинское значение. Поэтому необходимо понимать закономерности влияния условий среды на микроорганизмы.

Целью работы является оценка действия различных окислителей на антиоксидантную способность бактерий-деструкторов рода *Rhodococcus*.

Для определения активности антиоксидантных ферментов штаммов *Rhodococcus erythropolis* X5 и S67 был смоделирован окислительный стресс инкубацией бактерий в присутствии H_2O_2 и нафтохинона. В качестве источника углерода и энергии использовали алканы: гексадекан (C16) и нонадекан (C19), который является более труднодоступным за счет своего твердого агрегатного состояния. Бесклеточный экстракт получали, используя ультразвуковой метод дезинтеграции клеток, активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом. Ферментами первой линии защиты бактериальной клетки от активных форм кислорода являются супероксиддисмутаза и каталаза.

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

**Полученные результаты активности антиоксидантных ферментов
в зависимости от условий культивирования**

Полученные данные/штамм	Супероксиддисмутаза, усл. ед./мг белка				
	Контроль (среда LB)	Гексадекан (ж)	Нонадекан (тв)	Гексадекан (ж) + нафтохинон	Гексадекан (ж) + H ₂ O ₂
X5	0	9 ± 3	20 ± 7	60 ± 10	47 ± 2
S67	0	7 ± 3	23 ± 7	60 ± 10	150 ± 30
	Каталаза, мкмоль/(мин·мг белка)				
	Контроль (среда LB)	Гексадекан (ж)	Нонадекан (тв)	Гексадекан (ж) + нафтохинон	Гексадекан (ж) + H ₂ O ₂
X5	0,40 ± 0,05	0,9 ± 0,3	2,4 ± 0,5	4,3 ± 0,8	3,90 ± 0,06
S67	0,22 ± 0,04	0,6 ± 0,2	5,0 ± 0,4	2,2 ± 0,3	7 ± 1
	Пероксидаза, ×10 ⁻⁴ мкмоль/(мин·мг белка)				
	Контроль (среда LB)	Гексадекан (ж)	Нонадекан (тв)	Гексадекан (ж) + нафтохинон	Гексадекан (ж) + H ₂ O ₂
X5	0	20 ± 1	7 ± 3	9 ± 1	41 ± 6
S67	0	8 ± 3	0	24 ± 7	100 ± 20

Примечание. Контроль — штаммы, выращенные на богатой среде LB; Гексадекан (ж) и Нонадекан (тв) — штаммы, выращенные на минеральной среде Эванса с гексадеканом и нонадеканом в качестве субстратов соответственно; Гексадекан (ж) + пероксид/нафтохинон — клетки, полученные при культивировании на среде Эванса с гексадеканом при добавлении окислителя (до конечной концентрации 25; 0,1 мМ соответственно).

Супероксиддисмутаза (СОД) катализирует дисмутацию токсичного супероксидного радикала в перекись водорода и молекулярный кислород. Активность фермента измеряли по степени ингибирования кверцетина в щелочной среде [1]. Определение каталазы (КАТ) проводили по степени разрушения пероксида водорода [2]. Пероксидаза, как и каталаза, катализирует разложение пероксида, но в присутствии субстратов. По полученным результатам прослеживается закономерность увеличения активностей перечисленных ферментов в присутствии окислителей, в особенности перекиси водорода, что объясняется большим образованием активных форм кислорода. Однако инкубирование с H₂O₂ клеток *R. erythropolis* X5 и *R. erythropolis* S67 показывало наиболее высокую активность антиоксидантных ферментов для штамма S67, по сравнению с X5. Полученные результаты коррелируют с литературными данными, где в качестве стрессовых факторов используются различные воздействия на микроорганизмы, а именно: добавление арсенита [3, 4], бензоата [5], дизельного топлива [6], ПАУ [7], метилвиологена и H₂O₂. Воздействие данных стрессоров на родококки приводило в основном к значительному увеличению СОД и КАТ, а также влияло на накопление триацилглицеридов [3, 6, 8].

Таким образом, в данной работе показано защитное действие ферментов антиоксидантной системы бактерий-деструкторов углеводов нефти рода *Rhodococcus*, которые применяются для очистки территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, при различных условиях окружающей среды.

Литература

1. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. 1990. Т. 2. С. 88–91.
2. Aebi H. Catalase *in vitro* // Methods in Enzymology. Elsevier. 1984. Vol. 105. P. 121–126.
3. Jain R., Adhikary H., Jha S. et al. Remodulation of central carbon metabolic pathway in response to arsenite exposure in *Rhodococcus* sp. strain NAU-1: Study of *Rhodococcus* sp. strain NAU-1 exposed to arsenite // Microb. Biotechnol. 2012. Vol. 5, № 6. P. 764–772.
4. Liu S. X., Athar M., Lippai I. et al. Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. Vol. 98, № 4. P. 1643–1648.
5. Соляникова И. П., Сузина Н. Е., Емельянова Е. В. Морфо-физиологические и биохимические характеристики штамма 1СР — деструктора бензоата — в стрессовых условиях // Микробиология. 2017. № 2. С. 188–200.
6. Гоголева О. А., Немцева Н. В., Бухарин О. В. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48, № 6. P. 612–617.
7. Sakshi S. K., Haritash A. K. Catabolic enzyme activities during biodegradation of three-ring PAHs by novel DTU-1Y and DTU-7P strains isolated from petroleum-contaminated soil // Arch. Microbiol. 2021. Vol. 203, № 6. P. 3101–3110.
8. Urbano S. B., Di Capua C., Cortez N. et al. Triacylglycerol accumulation and oxidative stress in *Rhodococcus* species: differential effects of pro-oxidants on lipid metabolism // Extremophiles. 2014. Vol. 18, № 2. P. 375–384.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-130

ПЛАТФОРМА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БЕЗОПАСНЫХ СУБЪЕДИНИЧНЫХ ВАКЦИН

PLATFORM FOR THE DEVELOPMENT OF SAFE SUBUNIT VACCINES

М. М. Сухова¹, И. В. Красильников¹, А. А. Исаев²,
А. В. Вахрушева², А. В. Иванов¹, И. В. Цымбаревич¹

¹АО «Развитие Биотехнологий», Москва

²ПАО «Артген Биотех», Москва

M. M. Sukhova¹, I. V. Krasilnikov¹, A. A. Isaev²,
A. V. Vakhrusheva², A. V. Ivanov¹, I. V. Tsybparevich¹

¹Razvitie Biotekhnologii, JSC, Moscow

²Artgen Biotech, PJSC, Moscow

✉ suhova@betuvax.ru

Аннотация

В данной работе представлены вакцины, разработанные с использованием корпускулярного битулина в качестве адъюванта. Вакцины направлены на защиту против вируса гриппа, SARS-CoV-2 и их совокупности.

Abstract

This paper presents vaccines developed using corpuscular bitulin as an adjuvant. The vaccines aim to protect against the influenza virus, SARS-CoV-2, and their combination.

Разработана платформа на основе корпускулярного адъюванта для создания безопасных субъединичных вакцин. Платформа представляет собой вирусоподобные частицы диаметром 100–150 нм, сформированные природным битулином и его основаниями. Корпускулярный битулин (торговое наименование — «битусфера») в качестве адъюванта был использован для разработки нескольких субъединичных вакцин. Первая вакцина, четырехвалентная, содержит субъединичные моноваленты (H1, H3, B1, B2) вируса гриппа, адсорбированные на корпускулярном адъюванте. Доклинические и клинические исследования (этап 1–2) этой вакцины показали безопасность и высокую эффективность как на животных, так и на добровольцах. Вторая вакцина, против COVID-19, представляет собой рекомбинантный антиген, содержащий домены из S1 и S2 регионов поверхностного антигена вируса, соединенные с Fc фрагментом человеческого антитела, адсорбированный на корпускулярном адъюванте. Вакцина в доклинических и клинических исследованиях зарекомендовала себя как безопасный препарат, способный формировать специфический иммунитет против вируса SARS-CoV-2.

Данные, полученные по двум вакцинам, позволили приступить к разработке третьей вакцины — комбинированной. Комбинированная вакцина против вирусов гриппа и коронавируса содержит четыре антигена вирусов гриппа, которые входят в четырехвалентную вакцину и рекомбинантный антиген вируса SARS-CoV-2. Каждый из антигенов сорбируется на адъюванте, а затем формулируется в единый балк. На моделях животных показано, что антигены, входящие в состав комбинированной вакцины, вызывают синтез специфических антител по величине, не уступающий антигенному ответу при иммунизации животных моновалентной вакциной.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-131

**ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА
ИСКУССТВЕННОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНОГЕНА ПРОТИВ COVID-19*****IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES
OF AN ENGINEERED T-CELL IMMUNOGEN AGAINST COVID-19**

Е. В. Тигеева, М. Б. Боргоякова, А. П. Рудомётов, Е. В. Старостина, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова,
А. М. Задорожный, В. А. Яковлев, Г. А. Кудров, А. В. Шиповалов, О. В. Пьянков, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

E. V. Tigeeva, M. B. Borgoyakova, A. P. Rudometov, E. V. Starostina, D. N. Kisakov, L. A. Kisakova, A. M. Zadorozhny,
V. A. Yakovlev, G. A. Kudrov, A. V. Shipovalov, O. V. Pyankov, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ lena.tigeeva@gmail.com

Аннотация

В данной работе представлены результаты исследований иммуногенных и протективных свойств Т-клеточного полиэпитопного иммуногена BSI-CoV-Ub. Было показано, что разработанная конструкция индуцирует высокий уровень специфического клеточного иммунного ответа, а также обеспечивает защитный иммунитет против гамма-варианта вируса SARS-CoV-2.

Abstract

In this research, the immunogenic and protective properties of the T-cell polyepitope immunogen BSI-CoV-Ub were investigated. The developed DNA construct induces a high level of cellular immune response and provides protective immunity against the Gamma variant of SARS-CoV-2 virus.

Охватившая весь мир в 2019 г. пандемия COVID-19 спровоцировала резкий скачок в развитии вакцин, в том числе основанных на нуклеиновых кислотах. ДНК-платформа формирует оптимальные условия для разработки новых вакцин, позволяя создавать конструкции, кодирующие в том числе искусственные иммуногены, например Т-клеточные полиэпитопные конструкции. Это дает возможность модулировать иммунный ответ, вызывая реакции не только гуморального, но и Т-клеточного звена иммунитета, которые тесным образом связаны с формированием иммунологической памяти, элиминацией вирусной инфекции, а также формированием долгосрочного эффективного ответа. Это особенно актуально для SARS-CoV-2, новые варианты которого способны уклоняться от действия гуморального ответа. Последние исследования в данном направлении показывают, что значительный вклад в снижение тяжести протекания инфекции вносит именно ранняя активация Т-клеточного компонента иммунной системы.

Был спроектирован Т-клеточный полиэпитопный иммуноген — BSI-CoV-Ub, включающий консервативные фрагменты белков SARS-CoV-2, содержащие множество потенциальных Т-клеточных эпитопов. Полученная конструкция была клонирована в составе плазмидного вектора pVAX1, соответствующая плазида была названа pBSI-CoV-Ub.

Целью данной работы является исследование иммуногенных и протективных свойств искусственного Т-клеточного иммуногена — BSI-CoV-Ub, включающего Т-клеточные консервативные фрагменты различных белков вируса SARS-CoV-2.

Для экспериментов по оценке иммуногенности были взяты мыши линии BALB/c. 1-й группе внутримышечно вводили плазмиду pBSI-CoV-Ub с последующей электропорацией; 2-я группа, контрольная, включала в себя интактных неиммунизированных мышей. В следующем эксперименте для оценки протективных свойств одной группе мышей посредством внутримышечной инъекции вводили плазмиду pBSI-CoV-Ub; 2-я группа, состоящая из интактных мышей, также служила контролем (рис. 1).

* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© Е. В. Тигеева, М. Б. Боргоякова, А. П. Рудомётов, Е. В. Старостина, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, А. М. Задорожный, В. А. Яковлев, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв, 2023

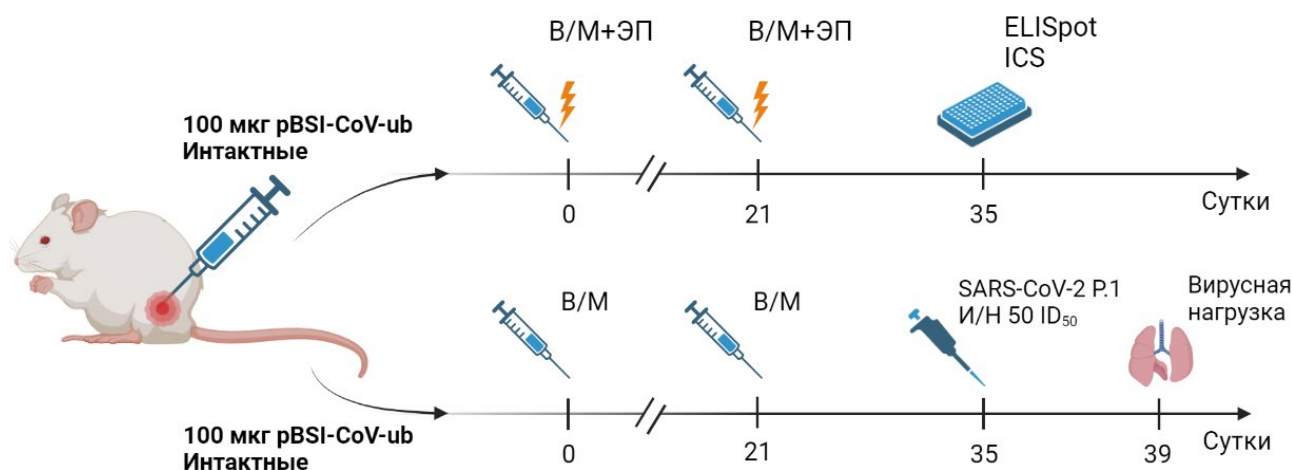


Рис. 1. Схема эксперимента по оценке иммуногенных и протективных свойств ДНК-вакцины

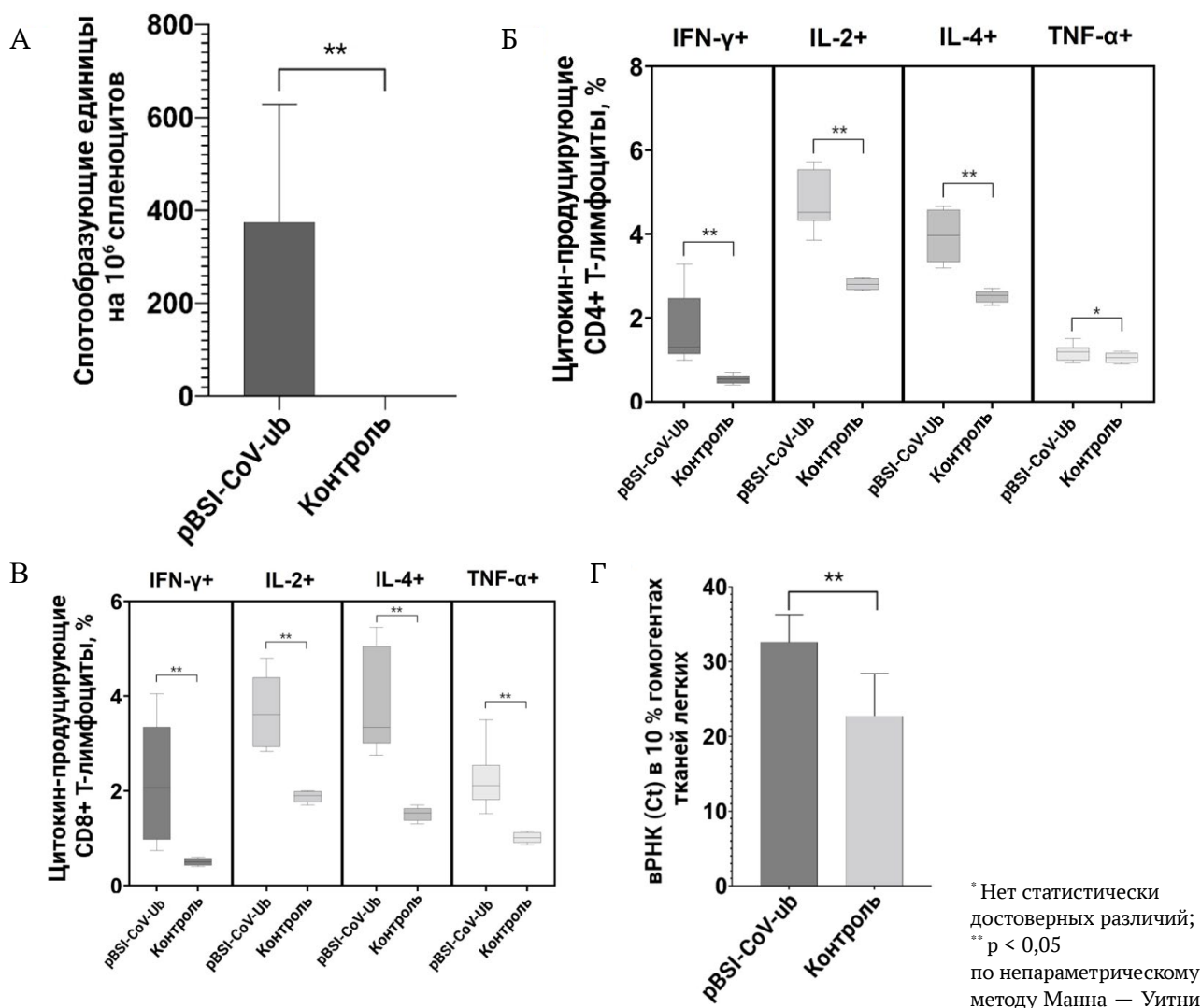


Рис. 2. Анализ иммуногенных и протективных свойств rBSI-CoV-Ub. А — число клеток, продуцирующих IFN γ (по данным ELISpot); Б, В — доля SARS-CoV-2-специфических цитокин-продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток (по данным ICS и проточной цитометрии); Г — вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения гамма-вариантом SARS-CoV-2

Анализ эффективности ДНК-конструкции рBSI-CoV-Ub в отношении формирования Т-клеточного иммунного ответа проводили на 14-е сутки после второй иммунизации с помощью методов ELISpot и ICS.

Данные IFN- γ -ELISpot показали, что через 2 недели после второй иммунизации наблюдается формирование специфического Т-клеточного иммунитета у мышей, которым вводили вакцинную конструкцию. Так, в группе, иммунизированной рBSI-CoV-Ub, среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ (на 10^6 спленоцитов), составило 359, что значительно превышало значения, полученные в контрольной группе (рис. 2, А).

Анализ Т-клеточного ответа с помощью метода ICS показал, что при иммунизации мышей кандидатной ДНК-вакциной рBSI-CoV-Ub формируются как CD8⁺, так и CD4⁺ Т-лимфоциты, которые после стимуляции специфическими вирусными пептидами способны продуцировать такие важные цитокины, как IFN- γ , IL-2, IL-4, TNF- α . Это свидетельствует о формировании сбалансированного вирусоспецифического Т-клеточного иммунного ответа, являющегося важным звеном противовирусной защиты (см. рис. 2, Б, В).

Протективные свойства кандидатной ДНК-вакцины оценивали на модели мышей, чувствительных к заражению гамма-вариантом вируса SARS-CoV-2 (штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021). Доза интраназального заражения составила 50 ИД₅₀. Снижение количества вирусной РНК в группе, иммунизированной ДНК-конструкцией рBSI-CoV-Ub, по сравнению с контролем составило 3,45 lg (32,48 Ct vs 21,00 Ct) (см. рис. 2, Г).

Таким образом, было показано, что после иммунизации мышей ДНК-конструкцией, кодирующей полиэпитопный иммуноген SARS-CoV-2 — BSI-CoV-Ub, наблюдается формирование вирусоспецифического Т-клеточного ответа, включая активацию цитотоксических и Т-хелперных лимфоцитов. Кроме того, было показано, что данная ДНК-вакцина способна эффективно индуцировать защитный иммунитет против гамма-варианта вируса SARS-CoV-2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-132

HORMONEMA MACROSPORUM КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОДУЦЕНТ МЕЛАНИНА**HORMONEMA MACROSPORUM AS A PROMISING MELANIN PRODUCER**

К. М. Тимохин, И. В. Старченко, Л. А. Беловежец

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

K. M. Timokhin, I. V. Starchenko, L. A. Belovezhets

Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS

✉ konstantin.timoxin@gmail.com

Аннотация

Меланины — класс полифункциональных соединений, который может являться решением проблемы адаптационных ресурсов человека. В работе проведено исследование микроорганизма *Hormonema macrosporum* в качестве перспективного продуцента меланинов. Был произведен подбор оптимальных условий для культивирования микроорганизма. Наилучшими оказались культивирование на жидкой глюкоза-коллагеновой среде и твердом сусло-агаре. Выход пигмента составил 30,23 %.

Abstract

Melanins are a class of polyfunctional compounds that may be a solution to the problem of human adaptive resources. In this work, we investigated the potential of the microorganism *Hormonema macrosporum* as a promising melanin producer. The optimal conditions for cultivation of the microorganism were selected. The best was cultivation on liquid glucose-collagen medium and solid mash-agar. The pigment yield amounted to 30,23 %.

Неблагоприятная экологическая ситуация пагубно влияет на человека, приводя к ухудшению здоровья. Решением для этой проблемы может быть поиск веществ, которые повысят сопротивляемость человека к отрицательному воздействию факторов окружающей среды. К таким соединениям относятся адаптогены. Среди них существует класс перспективных полифункциональных молекул, которые в перспективе могут значительно повысить адаптационные ресурсы человека — меланины.

Цель данного исследования — подбор оптимальных условий для культивирования *Hormonema macrosporum* в качестве перспективного продуцента меланина. Микроорганизм был выделен с зараженной древесины в п. Таежный в 2022 г.

Культивирование проводили на жидкой и твердой глюкоза-коллагеновой среде (ГКС) и на сусло-агаре (С/А) при 26 °С. Выделение биомассы выполняли при помощи фильтрования с твердых питательных сред и центрифугирования с жидких питательных сред. Меланины выделяли экстракцией 2%-м водным раствором NaOH в соотношении к биомассе 1 : 100 и осаждением 25 % HCl до показателя pH ниже 2 или 96 % C₂H₅OH в соотношении 1 : 4. Учет количества выделенных меланинов проводили гравиметрическим методом.

При культивировании *Hormonema macrosporum* на жидкой ГКС был получен следующий выход биомассы (табл. 1).

Таблица 1

Выход биомассы при глубинном культивировании на глюкоза-коллагеновой среде

Время культивирования, сут	Абсолютно сухая биомасса, г	Выход биомассы на 1 л питательной среды, г
7	0,22 ± 0,15	2,87 ± 0,11
14	0,4 ± 0,22	4,53 ± 0,29
21	0,53 ± 0,44	5,34 ± 1,5

Культивирование на твердых питательных средах происходило 21 сутки, выход биомассы представлен в табл. 2.

Таблица 2

Выход биомассы при поверхностном культивировании

Питательная среда	Абсолютно сухая биомасса, г	Выход биомассы на 1 л питательной среды, г
С/А	0,156 ± 0,029	6,245 ± 1,156
ГКС	0,128 ± 0,034	5,124 ± 1,136

Как показано в табл. 2, при твердофазном культивировании на среде С/А наблюдается больший выход биомассы. По сравнению с глубинным культивированием на ГКС, при культивировании на твердой среде С/А наблюдали более высокий выход биомассы.

Меланин был выделен из биомассы, культивированной на жидкой ГКС в течение 21 суток. Выход меланина составлял 30,23 % от полученной биомассы в пересчете на абсолютно сухое вещество.

Помимо гравиметрического анализа был проведен элементный анализ, результаты которого представлены в табл. 3.

Таблица 3

Элементный анализ меланина

Меланин	С	Н	Н	С	Зола
<i>Hormoneta macrosporum</i>	31,88	4,13	2,37	0,73	44,97
<i>Inonotus obliquus</i>	32,44	3,37	0,16	0,61	39,85

В табл. 3 представлено сравнение пигментов исследуемого и хорошо исследованного продуцентов меланина (*Inonotus obliquus*).

По наличию азота в исследуемом образце *H. macrosporum* можно предположить, что это эумеланин — пигмент, синтезируемый из L-ДОФА. Высокая зольность, скорее всего, связана с методом выделения меланинов, приводящим к появлению большого количества солей.

Таким образом, нами был проведен подбор условий для культивирования продуцента меланина *Hormoneta macrosporum*. Наилучшими условиями оказалось поверхностное культивирование на сусло-агаре, позволившее увеличить выход биомассы до 6,245 г/л, с выходом пигмента 30,23 %. Элементный анализ показал, что выделенный нами меланин значительно отличается от меланина *Inonotus obliquus* по содержанию азота. Можно предположить, что это эумеланин.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-133

**ЭНТОМОПАТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ
ГРАНУЛОВИРУСА В ОТНОШЕНИИ *CYDIA POMONELLA******ENTOMOPATHOGENIC ACTIVITY OF GRANULOVIRUS STRAINS AGAINST *CYDIA POMONELLA***

Н. С. Томашевич, А. А. Цыгичко

Федеральный научный центр биологической защиты растений, Краснодар

N. S. Tomashevich, A. A. Tsygichko

Federal Research Center of Biological Plant Protection, Krasnodar

✉ tom-s2@yandex.ru

Аннотация

В работе представлены результаты лабораторных исследований энтомопатогенной активности четырех штаммов вируса гранулеза яблонной плодовой гусеницы из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР в отношении гусениц природной популяции *C. pomonella*. Выделены наиболее эффективные штаммы вируса гранулеза яблонной плодовой гусеницы (BZR GV 11 и BZR GV L-3), уровень энтомопатогенной активности которых на 10-е сутки эксперимента составил 80,6 %.

Abstract

The paper presents the results of the four granulosa virus of the apple moth strains entomopathogenic activity from the bioresource collection of the Federal Research Center of Biological Plant Protection «State Collection of Entomoacariphages and Microorganisms» against *C. pomonella in vitro*. The most effective strains of the apple moth granulosa virus (BZR GV 11 and BZR GV L-3) were revealed. The level of entomopathogenic activity of them was 80,6 % on the tenth day of the experiment.

На сегодняшний день яблонные сады на территории РФ занимают около 220 тыс. га [1]. Данная культура повреждается насекомыми-вредителями, такими как яблонная плодовая гусеница *Cydia pomonella* L., 1758. При этом уровень повреждения плодов может достигать 70 % [2].

Основной мерой борьбы является своевременное применение средств защиты растений (СЗР) химической и биологической природы, а также агротехнические мероприятия в результате фитосанитарного мониторинга [3]. Среди инсектицидов наиболее узконаправленными и безопасными являются СЗР на основе энтомопатогенных вирусов. Согласно Государственному каталогу пестицидов, на территории РФ в 2023 г. против яблонной плодовой гусеницы разрешено применение двух препаратов на основе бакуловирусов: «Мадекс Твин, СК» (CpGV isolat V22, $3,0 \times 10^{15}$ гранул/л, Andermatt Biocontrol Suisse AG, Швейцария) и «Карповирусин, СК» (CpGV isolat M, $1,0 \times 10^{15}$ гранул/л, Arysta LifeScience Corporation, Франция). Зарегистрированных российских вирусных препаратов против *C. pomonella* в настоящий момент нет, поэтому существует необходимость в их разработке [4].

Основой вирусных инсектицидов является эффективный штамм, поэтому цель исследования — изучение энтомопатогенной активности штаммов вируса гранулеза яблонной плодовой гусеницы в отношении *C. pomonella*.

Объект исследования — штаммы вируса гранулеза яблонной плодовой гусеницы из биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» (БРК ФГБНУ ФНЦБЗР). Для проведения эксперимента использовали гусениц природной популяции *C. pomonella* возраста 2–5. Вирусные суспензии исследуемых штаммов готовили по стандартным методикам работы с бакуловирусами насекомых [5]. Их титр составил $3,0\text{--}4,0 \times 10^7$ гранул/мл. В качестве биологического эталона применяли «Мадекс Твин, СК» с титром не менее $3,0 \times 10^6$ гранул/мл. Насекомых инокулировали перорально за счет обработки искусственной питательной среды вирусными суспензиями. Использовали по 15 насекомых в трехкратной повторности на вариант. Учет гибели проводили на 3-и, 5-е, 10-е сутки после обработки. Обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 10. Энтомопатогенную активность штаммов оценивали по критерию биологической эффективности (БЭ) Хендерсона — Тилтона [5].

Установлено, что диапазон БЭ штаммов на 3–5-е сутки был на уровне 0–14,8 %. БЭ биологического эталона составила 50,5–53,3 %, что говорит о его высокой инсектицидной активности в первые дни наблюдений. На 10-е сутки БЭ исследуемых штаммов была на уровне 9,6–80,6 %. Следует выделить штаммы BZR GV 11

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда, ФГБНУ ФНЦБЗР в рамках научного проекта № МФИ-П-20.1/35.

и BZR GV L-3, эффективность которых была выше, чем в варианте с использованием препарата «Мадекс Твин, СК» на 12,9 % (см. таблицу).

Энтомопатогенная активность штаммов вируса гранулеза в отношении *C. pomonella*

№	Штамм/шифр	Титр, гранул/мл	БЭ, %		
			3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1	BZR GV 11	$2,4 \times 10^7$	5,7	3,8	80,6
2	BZR GV 14	$1,1 \times 10^7$	5,7	9,3	9,6
3	BZR GV L-1	$1,0 \times 10^7$	0	0	25,8
4	BZR GV L-3	$4,0 \times 10^7$	0,5	14,8	80,6
5	Мадекс Твин, СК	$3,0 \times 10^6$	50,2	53,3	67,7
6	Контроль (без обработки)	-	-	-	-

Таким образом, можно выделить наиболее эффективные штаммы вируса гранулеза яблонной плодовой гни (BZR GV 11 и BZR GV L-3), энтомопатогенная активность которых в отношении *C. pomonella* на 10-е сутки составила 80,6 %, что выше, чем при использовании биологического эталона.

В настоящее время в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск) осуществляется молекулярно-генетическая идентификация штаммов.

Литература

1. Agro XXI. Рынок переработки яблок. URL: <https://www.agroxxi.ru/analiz-rynka-selskohozjaistvennyh-tovarov/analiz-rynka-selskohozjaistvennyh-tovarov-rynok-pererabotki-jabloki.html> (дата обращения: 27.07.2023).
2. Цыгичко А. А., Асатурова А. М., Лобанов А. Г., Кузнецов А. Ю. Оценка энтомопатогенной активности вируса гранулеза в отношении яблонной плодовой гни // Достижения науки и техники АПК. 2023. Т. 37, № 5. DOI: 10.53859/023524512023350.
3. Бледных О. В., Гаецкий М. П., Чернышков В. В. Мониторинг численности яблонной плодовой гни (*Cydia pomonella* L.) на фоне применения средств защиты растений // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2020. № 11. С. 27–31. DOI: 10.17513/mjrf.13143.
4. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории РФ. Часть I. Пестициды. М.: МСХ РФ, 2023. 924 с.
5. Бондарчук Е. Ю., Цыгичко А. А., Асатурова А. М. Методические подходы к оценке энтомопатогенной активности микроорганизмов в отношении насекомых-вредителей *in vitro* (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 3 (27). С. 20–34. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-3-27-20-34.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-134

**НОРМАЛИЗАЦИЯ ОТКЛОНЕННЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ
ПРИ ЛАБОРАТОРНОМ ИСПЫТАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЛАЗМОФИЛЬТРА*****NORMALIZATION OF DEVIATED BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS
DURING LABORATORY TESTING OF AN EXPERIMENTAL PLASMA FILTER**

И. П. Троев, А. А. Слепцов, В. А. Алексеев

Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Якутск

I. P. Troev, A. A. Sleptsov, V. A. Alekseev

Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk

✉ ysumed@yandex.ru

Аннотация

Изготовлен лабораторный прототип гибридного плазмофильтра на основе живых гепатоцитов для экстракорпоральной коррекции и нормализации биохимических параметров крови пациентов с печеночной недостаточностью. Полученные результаты демонстрируют перспективные результаты для продолжения работы в целях изготовления биологического контура для клинического применения.

Abstract

A laboratory prototype of a hybrid plasma filter based on live hepatocytes for extracorporeal correction and normalization of biochemical blood parameters in patients with liver failure was made. The results obtained demonstrate promising results for further work in order to fabricate a biological circuit for clinical use.

Необратимая печеночная недостаточность является причиной смерти более 800 тыс. человек ежегодно и в настоящее время поддается лечению только трансплантацией донорского органа, которая в ряде случаев имеет ограничения и низкую эффективность. Для предотвращения деструкций и стимулирования регенеративного потенциала ткани активно разрабатываются технологии экстракорпоральной поддержки функции печени. Суть технологии заключается в обеспечении специфичных функций печеночных клеток и коррекции отклоненных биохимических параметров в крови пациентов за счет взаимодействия крови с культивированными клетками в специальном устройстве с последующим возвращением ее в организм. На различных стадиях разработки существует ряд аналогов: ELAD, HepatAssist, AMC-BAL, SRBAL, hiHep-BAL и BBALS [1–9]. Наиболее частой и существенной проблемой является их конструкция и ее низкая способность к воспроизводству и масштабированию.

В рамках настоящей работы нами предложена модель плазмофильтра — биочипа для эффективного взаимодействия плазмы с гепатоцитами. Биочип имеет конструкцию из трех послойно наложенных друг на друга спиралевидных полостей: полость-канал для перфузии питательного раствора, полость для культивирования гепатоцитов и полость-канал для движения плазмы (рис. 1). Высота каждого слоя — 1 мм. При эксплуатации предполагается последовательное подключение биочипов друг к другу посредством трубок к внешним средствам подачи и оттока жидкостей. Между слоями накладываются трековые мембраны с диаметром пор 5 мкм для нижней мембраны (см. рис 1, B2), 15 мкм для верхней (см. рис 1, A4), образуя нижние и верхние грани каналов, создавая своды полостей на каждом из слоев. На нижнюю мембрану осажены клетки линии гепатоцитов HepG2 (см. рис. 1, B1), обладающие большим пролиферативным потенциалом и пригодной для исследования функциональностью [10]. Функции верхней мембраны — циркуляция плазмы из верхней полости в нижнюю и обратно и препятствие попадания гепатоцитов в циркуляцию (см. рис. 1, A2).

Объектом испытаний является плазма 13 пациентов с диагнозом «Печеночная недостаточность». В качестве критерия для выборки было принято наличие отклоненных показателей 4 биохимических параметров, свидетельствующих о наличии печеночной дисфункции.

На одного пациента было подготовлено по 7 биочипов. Ориентировочное суммарное количество гепатоцитов в каналах достигало 1,2 млн ед. клеток. За сутки перед экспериментом подаваемая питательная среда заменялась на бессывороточную. Для определения концентрации веществ отбирался 1 мл плазмы с каждого образца до процедуры и весь объем, прошедший через биочипы. Исследование образцов проводилось при помощи автоматического биохимического анализатора.

* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования РФ (проект № FSRG-2022-0009).

© И. П. Троев, А. А. Слепцов, В. А. Алексеев, 2023

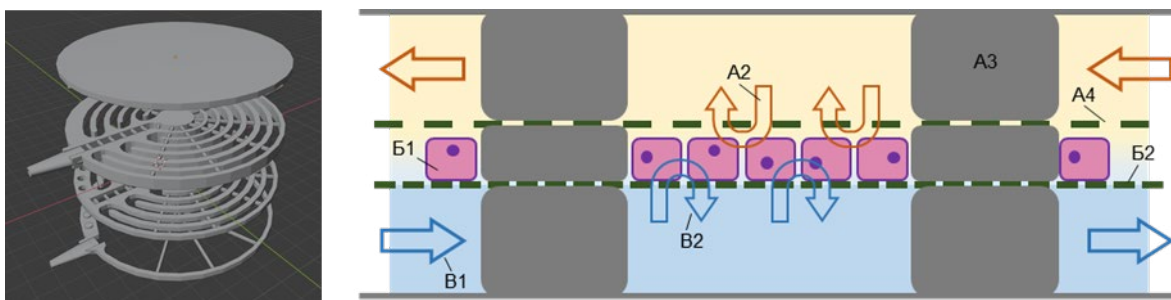


Рис. 1. Принцип сборки биочипа

В результате перфузии плазмы в 1 биочип наблюдается очевидная коррекция параметров биохимических показателей плазмы в сторону нормализации. Примечательно, что перфузия плазмы через 7 биочипов обеспечивает достоверную нормализацию параметров (рис. 2) по всем использованным для испытаний параметрам оценки биохимического состава (см. таблицу).

Средние значения показателей биохимических параметров по результатам испытаний

Параметр	Пределы нормы	До процедуры	После перфузии через 1 биочип	После перфузии через 7 биочипов
Альбумин (г/л)	35–53 г/л	29,7 г/л ± 4,62	31,5 г/л ± 5,29	43,8 г/л ± 6,68
Билирубин общий (мкмоль/л)	до 20,4 мкмоль/л	62,1 мкмоль/л ± 15,87	59,0 мкмоль/л ± 17,03	21,2 мкмоль/л ± 6,76
Билирубин прямой (мкмоль/л)	до 5,1 мкмоль/л	15,2 мкмоль/л ± 3,79	14,3 мкмоль/л ± 4,33	5,0 мкмоль/л ± 1,37
Мочевина (ммоль/л) (М)	3,2–7,3 ммоль/л	3,0 ммоль/л ± 0,12	3,2 ммоль/л ± 0,35	5,5 ммоль/л ± 1,15
Мочевина (ммоль/л) (Ж)	2,6–6,7 ммоль/л	1,8 ммоль/л ± 0,22	2,4 ммоль/л ± 0,7	5,8 ммоль/л ± 2,23

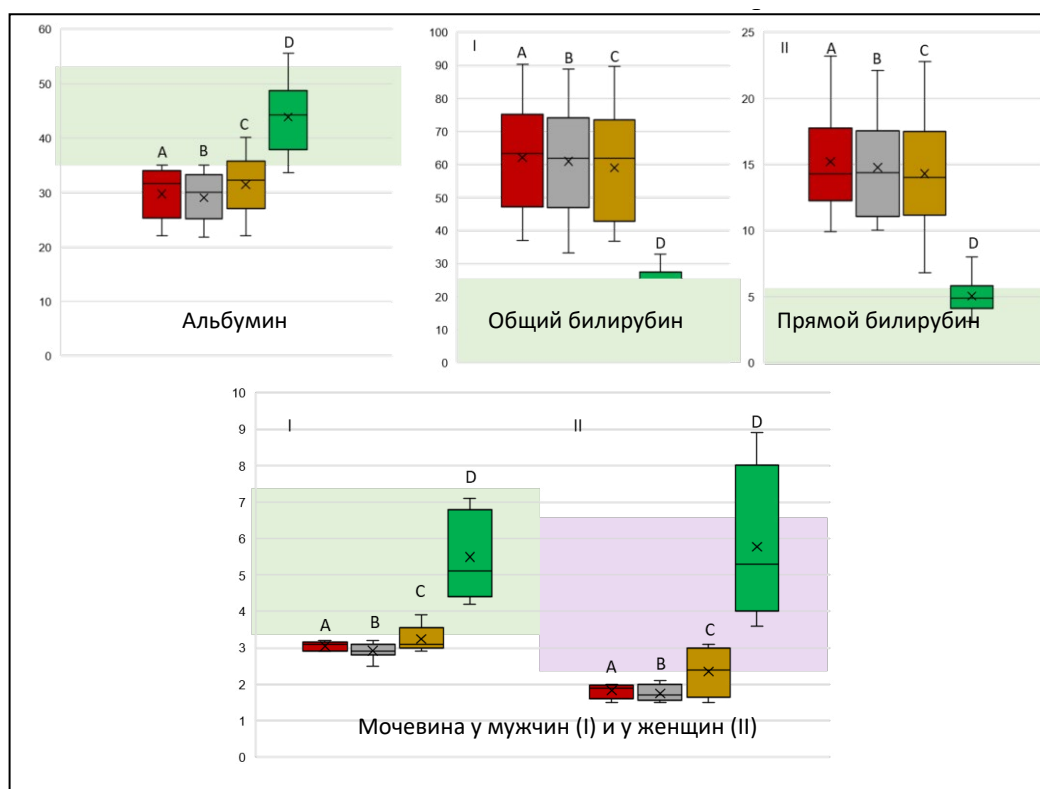


Рис. 2. Динамика концентраций компонентов плазмы до процедуры (А), после перфузии через 1 биочип без гепатоцитов (В), после перфузии через 1 биочип с гепатоцитами (С), после перфузии через 7 биочипов (D) (на фоне закрашена область, обозначающая пределы нормы)

Полученные данные свидетельствуют о способностях изготовленных биочипов при достаточном масштабировании к нормализации биохимических параметров, отклоненных при печеночной недостаточности.

Данное исследование демонстрирует результаты испытаний лабораторного образца и на данный момент не претендует без надлежащих условий контроля качества и масштабирования на клинические испытания. Однако полученные результаты дают основание полагать, что прототип является перспективной моделью для разработки новых терапевтических подходов для лечения печеночной недостаточности.

Литература

1. Demetriou A.A. et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure // *Ann. Surg.* 2004. Vol. 239 (5). P. 660.
2. Kelly J.H., Sussman N.L. The hepatic extracorporeal liver assist device in the treatment of fulminant hepatic failure // *Asaio J.* 1994. Vol. 40 (1). P. 83.
3. Lee K. C. L., Stadlbauer V., Jalan R. Extracorporeal liver support devices for listed patients // *Liver Transpl.* 2016. Vol. 22 (6). P. 839.
4. Nibourg G.A. A. et al. Increased hepatic functionality of the human hepatoma cell line HepaRG cultured in the AMC bioreactor // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. Vol. 45 (8). P. 1860–1868.
5. Nicolas C.T. et al. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts // *Stem Cells.* 2017. Vol. 35 (1). P. 42–50.
6. Shi X. L. et al. Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes // *Cell Res.* 2016. Vol. 26 (2). P. 206–216.
7. Thompson J. et al. Extracorporeal cellular therapy (ELAD) in severe alcoholic hepatitis: a multinational, prospective, controlled, randomized trial // *Liver Transpl.* 2018. Vol. 24 (3). P. 380–393.
8. Van de Kerkhove M.P. et al. Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research // *Dig. Surg.* 2005. Vol. 22 (4). P. 254–264.
9. Wang J., Ren H., Liu Y. et al. Bioinspired artificial liver system with hiPSC-derived hepatocytes for acute liver failure treatment // *Cell Stem Cell.* 2023. Vol. 32 (4). P. 557–572.
10. Huang P., Zhang L., Gao Y. et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes // *Nature.* 2011. Vol. 475 (7356). P. 386–389.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-135

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МТЭ

LEVEL OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY DETERMINATION USING MFC

Э. В. Трушлис¹, А. Е. Новосадская^{1,2}, А. А. Лазукин³¹Белорусский государственный университет, Минск²Тюменский государственный университет³Университет ИТМО, Санкт-ПетербургE. V. Trushlis¹, A. E. Novosadskaya^{1,2}, A. A. Lazukin³¹Belarusian State University, Minsk²Tyumen State University³ITMO University, Saint Petersburg

✉ anastasianovosadskaa@gmail.com

Аннотация

Разработана методика определения степени антимикробной активности с использованием микробного топливного элемента (МТЭ). Показано, что МТЭ может быть использован как биосенсор, что позволяет разрабатывать новые экспресс-методы определения антимикробной активности для различных агентов.

Abstract

A method for determining the level of antimicrobial activity using microbial fuel cell (MFC) has been developed. It has been shown that MFC can be used as a biosensor, which makes it possible to develop new express methods for determining antimicrobial activity for various agents.

В настоящее время актуальной проблемой является трудность определения устойчивости бактерий к антибиотикам. Разработка новых методик экспресс-тестирования осложнена необходимостью выращивания культуры бактерий с последующей оценкой культуральных свойств. Решением может быть оценка физиологической активности микроорганизмов непосредственно во время их роста. Подобную оценку может обеспечить микробный топливный элемент, в котором количество генерируемого электрического тока является функцией их физиологической активности. Используя МТЭ в качестве прибора для оценки физиологической активности бактерий, можно делать вывод о влиянии антибактериальных агентов на физиологию микроорганизмов.

В исследовании были сконструированы двухкамерные МТЭ [1]. Двухкамерные МТЭ позволяют производить культивацию бактерий только в анодной камере, что позволяет избежать контаминации при сохранении работы системы. Данная особенность позволяет выращивать чистую культуру в жидкой питательной среде с последующим воздействием на нее антимикробными агентами [2]. Объем каждой из камер — 20 мл, площадь мембраны составила 2,84 см². В работе использовалась ионселективная мембрана МФ4С производства компании «Пластоплимер». В качестве электродов использовался карбонизированный углеродный войлок «Карбопон» в виде квадратных отрезков со сторонами 5 × 5 см и общей площадью 25 см².

Для обеспечения возможности регистрации действия яда на клетки микроорганизмов в реальном времени был отдельно разработан прибор для снятия электрического потенциала с МТЭ. Прибор изготовлен на основе микроконтроллера Atmega328P с подключенным к нему дисплеем для вывода информации. Данные об измерениях сохранялись на microSD карту. Периодичность регистрации данных составляла полминуты.

В качестве модельного организма был выбран штамм *Staphylococcus aureus*. В качестве антимикробного агента был выбран яд гадюки обыкновенной *Vipera berus* [3]. Яд обладает мембранным механизмом действия, образует поры в клеточных мембранах, что приводит к гибели микроорганизмов и, как следствие, снижению мощности МТЭ [4].

В качестве дублирующего антимикробного агента был выбран антибиотик «Фортикарб», полученный в ИБОХ НАН РБ. Антибиотик обладает активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Механизм действия также мембранный [4].

В рамках проведения эксперимента вносился яд объеме 200 мкл в анодную камеру МТЭ. Исходная концентрация яда составляла 99 %. Яд добавлялся после работы МТЭ в течение суток (рис. 1).

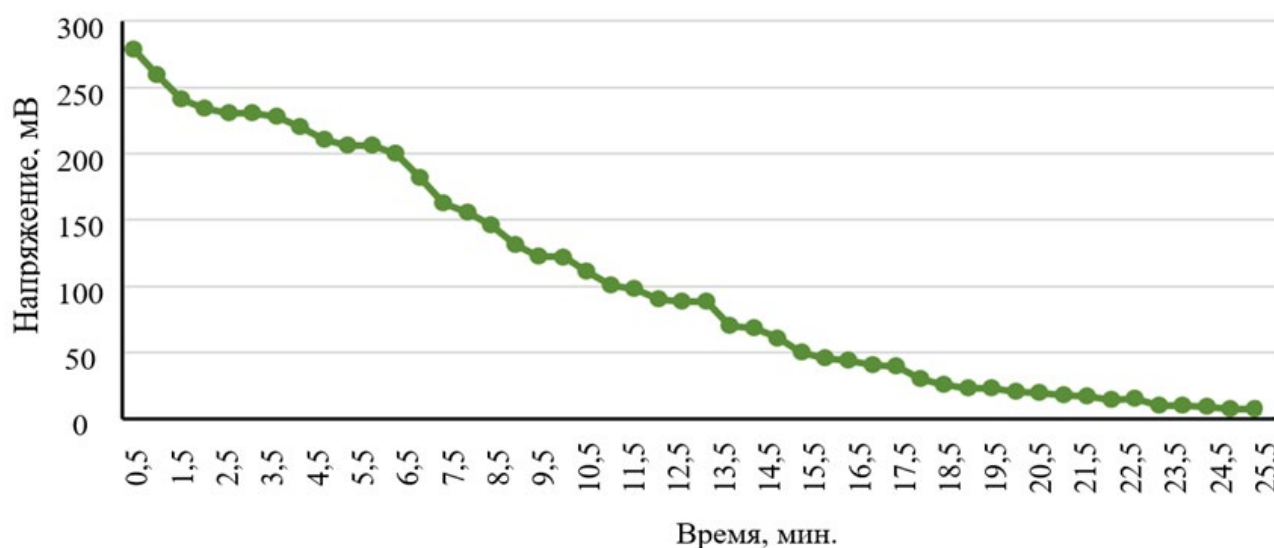


Рис. 1. Результаты электрогенеза *St. aureus* при добавлении концентрированного (99 %) яда гадюки обыкновенной *Vipera berus* объемом 200 мкл. Измерения фиксируются раз в 30 с

Анализируя данные, представленные на рис. 1, можно отметить, что в первые минуты после внесения яда происходило резкое снижение напряжения. Напряжение снижалось вплоть до нескольких мВ на протяжении 25 мин. Отсюда следует, что яд *Vipera berus* привел к нарушению клеточных мембран бактерий и, как следствие, снизил напряжение.

В рамках второго эксперимента оценивался антибиотик «Фортикарб». Антибиотик вносился в концентрации 50 мг/мл. Вносимый объем составил 200 мкл на 20 мл ночной культуры. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.

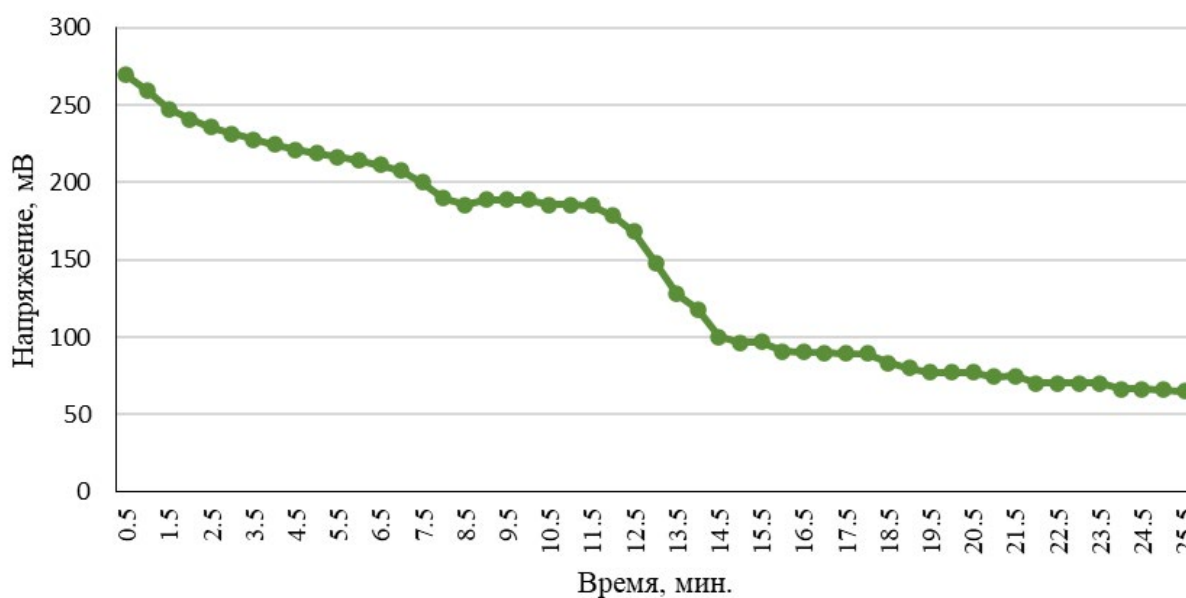


Рис. 2. Результаты электрогенеза *St. aureus* при добавлении 200 мкл антибиотика «Фортикарб» концентрацией 50 мг/мл. Измерения фиксируются раз в 30 с

Анализируя данные, представленные на рис. 2, можно отметить, что электрогенез снижается медленнее относительно яда *Vipera berus*. Вероятно, это происходит вследствие более высокой антимикробной активности.

Таким образом, показана возможность генерации электрического тока посредством микроорганизмов, а также показана возможность использования микробных топливных элементов в качестве биосенсора для определения активности антимикробных компонентов на примере бактерий *Staphylococcus aureus*.

Литература

1. Microbial Fuel Cell. Springer International Publishing, 2018. DOI:10.1007/978-3-319-66793-5.
2. Zhou M., Chi M., Luo J., He H., Jin T. An overview of electrode materials in microbial fuel cells // Journal of Power Sources. 2011. № 196. P. 4427–4435.
3. Sitprija V., Boonpucknavig V. Snake Venoms and Nephrotoxicity in Snake Venoms // Springer Berlin Heidelberg. 1979. № 52. С. 997–1018.
4. Юрьевич А. А., Георгиевна Р. Е., Сергеевич О. Д., Андреевна К. Е. Биологическая активность и молекулярно-клеточные механизмы действия антимикробных пептидов человека и животных // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. 2014. С. 5–25.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-136

БЫСТРЫЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСОВ RAPID IMMUNOCHEMICAL METHODS FOR THE DETECTION OF ORTHOPOXVIRUSES

Н. Д. Ушкаленко, А. В. Ерш, П. В. Филатов, А. Г. Полтавченко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

N. D. Ushkalenko, A. V. Ersh, P. V. Filatov, A. G. Poltavchenko

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ ushkalenko@yahoo.com

Аннотация

В рамках работы предполагается создание быстрых и чувствительных способов иммунохимического выявления ортопоксвирусов. Методы основаны на одностадийных дот-анализе на белковых матрицах и ИФА. Исследования проводили на вирусных культурах и клинических образцах от кроликов и мышей. Диапазон чувствительности выявления вирусного материала в дот-анализе 10^3 – 10^4 БОЕ/мл, ИФА 10^2 – 10^3 БОЕ/мл, а для клинических образцов 10^4 БОЕ/мл показали оба метода.

Abstract

The aim of work is to develop rapid and sensitive methods for the immunochemical detection of poxviruses. The methods are based on one-step dot-analysis using protein arrays and ELISA. Studies were performed on viral cultures and clinical samples from rabbits and mice. The sensitivity range for detecting viral material in the dot-analysis is 10^3 – 10^4 PFU/ml, ELISA 10^2 – 10^3 PFU/ml, and for clinical samples 10^4 PFU/ml both methods showed.

Введение

Род *Orthopoxvirus* включает патогенные для человека вирусы: натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО), оспы коров (ВОК) и осповакцины (ВОВ) [1]. ВОК и ВОВ могут вызывать у человека локализованные инфекции, купирующиеся самостоятельно в течение 3–4 недель, а ВНО и ВОО характеризуются контагиозными системными заболеваниями, нередко имеющими летальный исход. Вспышка ВОО в мае 2022 г. приобрела массовый характер и распространилась на все континенты. В мире было зарегистрировано более 85 тыс. случаев (2 случая в России), из которых 97 закончились летальным исходом [2]. В условиях прекращенной в 1980 г. массовой вакцинации против ВНО ортопоксвирусы (ОПВ) представляют возрастающую опасность для населения, и создание эффективных средств их распознавания является актуальной задачей.

Целью работы является создание простых, быстрых и чувствительных способов иммунохимического выявления поксвирусов, пригодных для использования в полевых условиях и/или ограниченных требованиями биобезопасности лабораторных условиях.

Материалы и методы

В работе реализованы дот и иммуноферментный (ИФА) анализ. Дот-анализ на пластиковых подложках с использованием конъюгатов на основе коллоидного золота и визуальным учетом результатов выполняли в течение 35 мин при комнатной температуре, а ИФА проводили с применением термошейкера в течение 40 мин при температуре 37 °С. Оба способа выполняли в одностадийной постановке, совмещая стадии инкубации с образцом и конъюгатом. В том и другом вариантах в качестве реагентов захвата и детекции применяли поликлональные антитела из сыворотки кролика, иммунизированного осповакциной. В качестве исследуемых образцов использовали криолизаты культуральных образцов ОПВ и клинические образцы от инфицированных кроликов и мышей, а для контроля специфичности применяли антигены возбудителей, вызывающих заболевания со схожими симптомами и неинфицированную культуру клеток.

Результаты

Результаты сравнительной оценки лимитов выявления доступных ОПВ представлены в таблице.

Результаты позволяют сделать вывод о том, что диапазон чувствительности для дот-анализа находится в диапазоне 10^3 – 10^4 БОЕ/мл, а для ИФА — в диапазоне 10^2 – 10^3 БОЕ/мл. Исследование клинических образцов от инфицированных кроликов и мышей (кровь, гомогенаты органов, корочки) показало, что оба варианта анализа

могут уверенно выявлять наличие возбудителя в образцах при вирусной нагрузке, превышающей 10^4 БОЕ/мл. ИФА вдвое превосходит дот-анализ по чувствительности, но требует наличия термостойкера и ридера для учета результатов, поэтому может применяться только в лабораторных условиях. Напротив, набор для дот-иммуноанализа полностью укомплектован, не требует дополнительного оборудования и энергообеспечения, позволяет получать результаты в течение 35 мин при окружающей температуре от 18 до 40 °С путем простых манипуляций, допускает визуальный учет результатов и может использоваться как непосредственно в очаге поражения, так и в условиях лаборатории с высоким уровнем биобезопасности, где возможности манипуляций существенно ограничены.

Лимиты выявления ортопоксвирусов в дот-иммуноанализе и ИФА

Вирус	Исходный титр, БОЕ/мл	Дот-анализ		ИФА	
		Развед.	Титр, БОЕ/мл	Развед.	Титр, БОЕ/мл
ВОО штамм V79-1-005	$4,0 \times 10^6$	1/1600	$2,5 \times 10^3$	1/3200	$1,25 \times 10^5$
ВОВ штамм ABCN]	$6,9 \times 10^8$	1/6400	$1,1 \times 10^5$	1/6400	$1,1 \times 10^5$
ВОВ штамм_A34R_[D110N_K151E]	$1,1 \times 10^6$	1/800	$1,4 \times 10^3$	1/800	$1,4 \times 10^3$
ВОВ штамм ЛИВП	$1,1 \times 10^7$	1/6400	$1,8 \times 10^3$	1/12800	$8,6 \times 10^2$
ВЭ штамм К-1	$2,3 \times 10^6$	1/800	$2,8 \times 10^3$	1/800	$2,8 \times 10^3$
ВОВ штамм штамм GRI-90	$9,8 \times 10^6$	1/800	$1,2 \times 10^4$	1/1600	$6,1 \times 10^3$
ВОВ штамм Утрехт	$1,0 \times 10^6$	1/1600	$6,2 \times 10^2$	1/3200	$3,2 \times 10^2$
Контроли	Культура клеток	0	0	0	0
	Ветр. оспа	0	0	0	0
	Корь	0	0	0	0
	Краснуха	0	0	0	0

Примечание. Положительным результатом в дот-анализе считали наличие отчетливо видимого темного пятна в области тестовой точки, а в ИФА — результат, превышающий ОПкрит. Лимит определения высчитывали как частное от деления исходного титра образца на его предельное разведение.

Выводы

Разработанные способы выявления ОПВ чувствительны, специфичны, быстры и могут быть эффективными при обнаружении вирусной угрозы в различных приложениях биологической защиты.

Литература

1. Shchelkunov S. N., Marennikova S. S., Moyer R. W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005. 425 p. URL: <https://doi.org/10.1007/b107126>.
2. Мрор (Monkeypox) Outbreak: Global Trends World Health Organization Produced on 09 May 2023. URL: https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-137

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ
ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1*****STUDY OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY OF GLYCYRRHIZIC ACID DERIVATIVES
AGAINST HIV-1 ENV-PSEUDOVIRUSES**А. А. Фандо¹, Н. Б. Рудомётова¹, Н. С. Щербакова¹, Д. Н. Щербаков¹,
В. В. Фоменко², Н. Ф. Салахутдинов², Л. И. Карпенко¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАНA.A. Fando¹, N.B. Rudometova¹, N.S. Shcherbakova¹, D.N. Shcherbakov¹,
V.V. Fomenko², N.F. Salakhutdinov², L.I. Karpenko¹¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo²Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk

✉nastyafando@gmail.com

Аннотация

Данная работа была направлена на исследование антивирусной активности производных глицирризиновой кислоты в отношении env-псевдовирuсов ВИЧ-1. В результате проделанной работы было показано, что наибольшую противовирусную активность в отношении env-псевдовирuсов ВИЧ-1 проявили триникотинаты глицирризиновой кислоты.

Abstract

This work was aimed at studying the antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against HIV-1 env-pseudoviruses. As a result of this work, it was shown that glycyrrhizic acid trinicotinatates showed the highest antiviral activity against HIV-1 env-pseudoviruses.

В настоящее время поиск новых антивирусных препаратов против ВИЧ-1 является актуальной задачей, поскольку существуют факторы, затрудняющие борьбу с вирусом, а именно высокая частота генетических изменений в процессе репликации ВИЧ, развивающаяся при этом резистентность к используемым препаратам, их высокая токсичность и стоимость. Перспективным направлением в создании новых антиретровирусных препаратов является разработка ингибиторов проникновения ВИЧ-1, которые блокируют проникновение вируса в клетки-мишени. Для поиска и оценки эффективности таких препаратов наилучшим образом зарекомендовала себя технология env-псевдовирuсов ВИЧ-1. Одним из привлекательных объектов в качестве основы для новых антиретровирусных препаратов является глицирризиновая кислота и ее производные.

Цель работы — исследование антивирусной активности производных глицирризиновой кислоты в отношении env-псевдовирuсов ВИЧ-1.

В данной работе в отношении env-псевдовирuсов ВИЧ-1, относящихся к подтипу В и к рекомбинантной форме CRF63_02A, была исследована противовирусная активность 26 препаратов на основе глицирризиновой кислоты, которые были синтезированы в лаборатории физиологически активных соединений НИОХ СО РАН. Среди протестированных образцов представлены мооникотинаты глицирризиновой кислоты, триникотинаты глицирризиновой кислоты, дегидратированные формы триникотинатов глицирризиновой кислоты и гликозиды никотиновой кислоты. На первом этапе для тестируемых образцов была исследована цитотоксичность в отношении клеточной линии TZM-bl. В результате было показано, что диапазон CC_{50} для исследуемых препаратов составил от 198 до 1000 мкМ. На втором этапе было проведено исследование противовирусной активности препаратов с использованием env-псевдовирuсов ВИЧ-1. В результате было установлено, что наибольшую ингибирующую активность проявили триникотинаты глицирризиновой кислоты, для которых диапазон значений IC_{50} и SI составил 6,25–79,43 мкМ и 65–155 соответственно.

* Работа выполнена в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

© А. А. Фандо, Н. Б. Рудомётова, Н. С. Щербакова, Д. Н. Щербаков, В. В. Фоменко, Н. Ф. Салахутдинов, Л. И. Карпенко, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-138

**ИЗУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА *CURCUMA LONGA* L. КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ*****STUDY OF *CURCUMA LONGA* L. EXTRACT AS A PROMISING SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES WITH ANTIOXIDANT ACTION**

А. Д. Фокина, И. С. Миленьева

Кемеровский государственный университет

A. D. Fokina, I. S. Milentieva

Kemerovo State University

✉ fadan-2001@mail.ru

Аннотация

Curcuma longa L. — растительное сырье с богатым фитохимическим составом (куркумин, флавоноиды, витамины группы В, С и К, фосфолипиды, карназоловая кислота), оказывающим противовоспалительное, гипогликемическое, антиоксидантное, иммуномодулирующее действие на организм человека, а также воздействие на окислительный стресс, сердечно-сосудистую систему, регулируя уровень вредного холестерина и замедляя возникновение тромбов в крови.

Abstract

Curcuma longa L. is a plant material with a rich phytochemical composition: curcumin, flavonoids, vitamins B, C and K, phospholipids, carnosolic acid, which has an anti-inflammatory, hypoglycemic, antioxidant, immunomodulatory effect on the human body, and also affects oxidative stress, the cardiovascular system, regulating the level of harmful cholesterol and slowing down the occurrence of blood clots.

В настоящее время растет интерес биотехнологов к использованию природной флоры планеты с целью поиска источника индивидуальных биологически активных веществ (БАВ), которые препятствуют возникновению различных заболеваний, способствуют увеличению продолжительности жизни, воздействуют на все основные жизнеобеспечивающие системы организма человека.

Цели работы — получение экстракта *Curcuma longa* L., выделение и изучение биологически активных веществ витаминного и антиоксидантного составов.

Для получения экстракта *Curcuma longa* L. в качестве экстрагента использовался 40, 70 и 95%-й этиловый спирт в соотношении (растительное сырье к экстрагенту) — 1 : 10, 1 : 20, 1 : 80, 1 : 100 соответственно. Температура водно-спиртовой экстракции составляла 30 °С и 60 °С, время экстрагирования — 30 мин и 4 ч [2]. Спектрофотометрическое исследование по определению антиоксидантных свойств полученных экстрактов проводили на спектрофотометре ТСС-240А с использованием раствора АВТС.

Определение содержания флавоноидов (рутина и кверцетина) в экстракте *Curcuma longa* L. проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [1]. В качестве элюента использовали раствор *n*-бутанол с ледяной уксусной кислотой с добавлением воды (4 : 1 : 5).

Было определено содержание восстановленной формы аскорбиновой кислоты в экстракте *Curcuma longa* L. Исследование было направлено на способность витамина С обратимо окисляться и восстанавливаться из-за наличия в составе молекуле диэнольной группировки.

Анализ качественного и количественного состава витаминов А, D, Е, В проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu LC-20.

По результатам исследований у растительного объекта *Curcuma longa* L. выявлен высокий процент содержания БАВ антиоксидантного действия, который составил $78,34 \pm 3,92$ при оптимальных параметрах проведения экстракции: температура инкубации составила 60 °С, продолжительность экстракции — 4 ч, экстрагент — 95%-й этиловый спирт, соотношение сырья к экстрагенту — 1 г : 10 мл.

Результаты определения величины относительной скорости перемещения флавоноидов (*R_f*) (рутина и кверцетина) на основе экстракта *Curcuma longa* L. методом ТСХ представлены в таблице.

* Работа выполнена в рамках государственного задания № FZSR-2023-0002.

© А. Д. Фокина, И. С. Миленьева, 2023

Результаты определения величины относительной скорости перемещения флавоноидов (R_f)

Наименование растительного сырья	Значение R_f зон на хроматограмме извлечения из экстрактов на основе растительного сырья		
	R_{f_1} , см	Рутин R_{f_2} , см	Кверцетин R_{f_3} , см
<i>Curcuma longa</i> L.	$0,96 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,05$

Таким образом, по результатам анализа ТСХ в *Curcuma longa* L. содержатся флавоноиды (рутин, кверцетин), что свидетельствует о перспективности использования сырья как дополнительного источника флавоноидов.

Результат исследования содержания восстановленной формы аскорбиновой кислоты в экстракте на основе растительного сырья *Curcuma longa* L. составил 2,20 мг/30 г исходного продукта.

По результатам анализа качественного и количественного состава жирорастворимых витаминов в образце методом ВЭЖХ определили наличие витамина Е (рис. 1) в образце *Curcuma longa* L. и его количественное содержание — 0,076 мкг/мл.

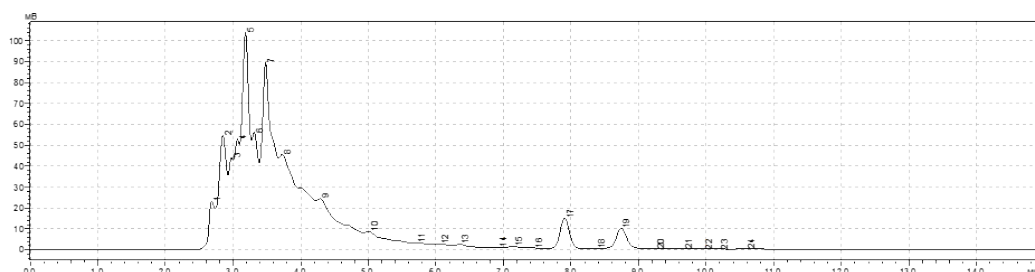


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ анализа образца *Curcuma longa* L. на содержание витамина Е: пик 17, 19 — витамин Е

По результатам ВЭЖХ анализа образца *Curcuma longa* L. обнаружили содержание водорастворимых витаминов группы В: В1 — 0,47; В2 — не выявлено, В3 — 0,185; В5 — 0,240; В6 — не выявлено (рис. 2).

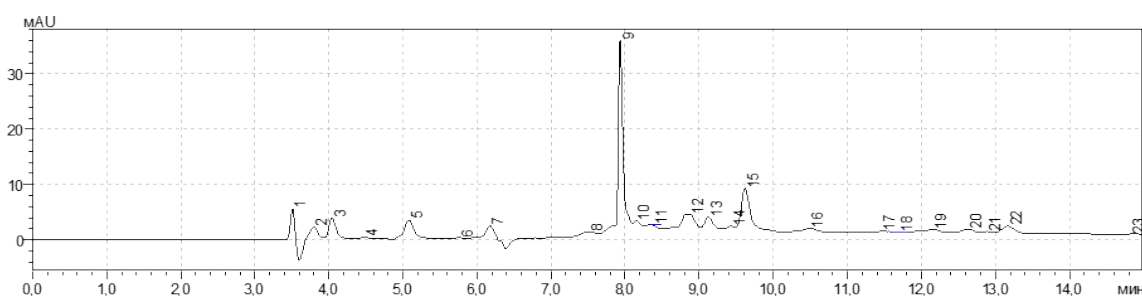


Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖХ анализа образца *Curcuma longa* L. на содержание водорастворимых витаминов: пик 9 — витамин В1, пик 12, 13 — витамин В3, пик 15 — витамин В5

Исследуемое растительное сырье *Curcuma longa* L. соответствует всем нормам и требованиям, предъявляемым к качеству растительного сырья.

Литература

1. Тринеева, О. В., Сафонова И. И., Сафонова Е. Ф. Определение флавоноидов и исследование влияния условий хранения на их содержание в плодах облепихи методом ТСХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т. 12, № 5. С. 1–8.
2. Фокина А. Д., Милентьева И. С. Подбор параметров экстракции одуванчика лекарственного, лопуха большого куркумы длинной и алоэ вера на основе их антиоксидантной активности // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Кемерово: Кемеровский гос. ун-т, 2023. С. 481–483.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-139

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ВСЛ-2
К КАЛЛУСОГЕНЕЗУ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO******DETERMINATION OF THE POTENTIAL OF THE VSL-2 CLONAL ROOTSTOCK
FOR CALLUS FORMATION *IN VITRO***

Н. Г. Фоменко, О. О. Жолобова

*Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций
и защитного лесоразведения РАН, Волгоград*

N. G. Fomenko, O. O. Zholobova

Federal Scientific Center of Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation RAS, Volgograd

✉ fomenko-n@vfanc.ru

Аннотация

В статье представлены результаты оценки способности клонового подвоя ВСЛ-2 к индукции каллусогенеза. Описаны структурно-морфологические особенности сформировавшегося первичного каллуса в зависимости от концентрации и вида синтетического фитогормона.

Abstract

The article presents the results of assessing the ability of the clone rootstock VSL-2 to induce callusogenesis. The structural and morphological features of the formed primary callus are described depending on the concentration and type of synthetic phytohormone.

ВСЛ-2 является среднерослым клоновым подвоем российской селекции, который был получен в результате скрещивания вишни степной (*Prunus fruticosa* Pall.) и вишни пильчатой (*Prunus serrulata* Lindl.). Основными преимуществами данного подвоя являются его морозо- и засухоустойчивость, устойчивость к бактериальному раку, корневым гнилям и болезням листьев, а также то, что он не образует корневую поросль. Растение размножается зелеными и полуодревесневшими черенками, а также имеет высокий коэффициент размножения при использовании метода микроклонального размножения. Наряду с вышеперечисленными методами перспективным является метод соматического эмбриогенеза, который позволяет значительно ускорить генетико-селекционные исследования и увеличить количество производимого посадочного материала [1, 2].

Целью данного исследования было определение способности ВСЛ-2 к образованию первичного каллуса в условиях *in vitro*.

В качестве эксплантов использовали микропобеги и листья растений регенерантов, которые были заранее выращены в асептических условиях. Индукцию каллуса осуществляли на питательных средах Мурасига и Скуга [3], дополненных синтетическими фитогормонами 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-D) и тидиазуром (TDZ) в 5 концентрациях от 0,5 до 2,5 мг/л, с интервалом 0,5. Культивировали на фитостеллажах СТЕЛЛАР-ФИТО LINE (Россия) с фотопериодом 16 ч при температуре 22–24 °С, в течение 28 дней. Индукцию каллусогенеза (ИК) рассчитывали по формуле [4]:

$$ИК = \frac{\text{кол-во каллуса, индуцированное эксплантами}}{\text{общее кол-во инокулированных эксплантов}} \cdot 100\%.$$

В результате проведенного исследования было установлено, что клоновый подвой ВСЛ-2 способен к каллусообразованию. Прямая зависимость индукции от концентрации фитогормона не отмечалась. Максимальные показатели были зафиксированы на высоких концентрациях цитокинина и ауксина: TDZ 2,5 мг/л (67,1 %), 2,4-D 2 и 2,5 мг/л (67,1 % и 83,3 % соответственно). Подробные результаты представлены в таблице.

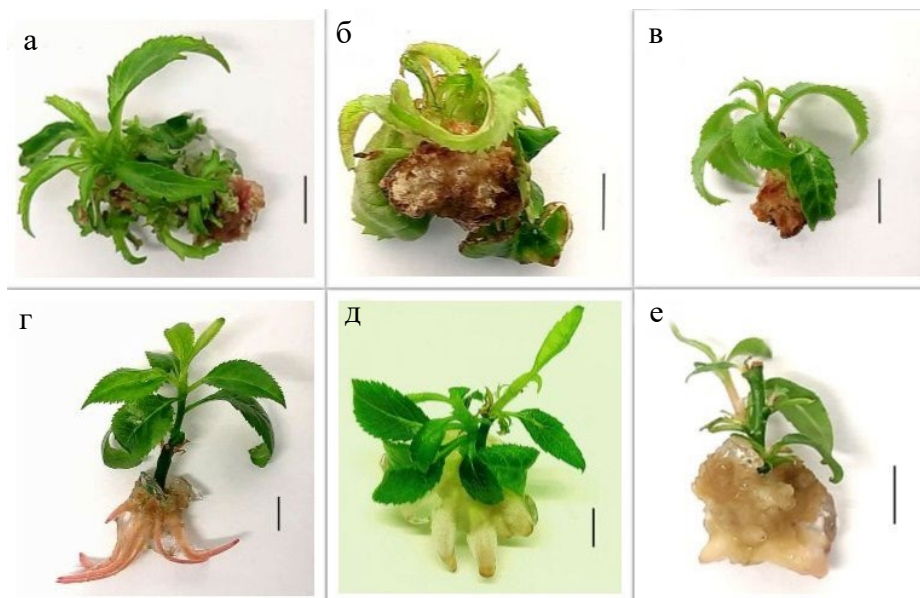
* Работа выполнена в рамках государственного задания НИР ФНЦ агроэкологии РАН № 122020100427-1 «Разработать научные основы сохранения и воспроизводства ценных генотипов древесных и кустарниковых растений в культуре *in vitro*» (FNFE-2022-0008).

Индукция каллусогенеза ВСЛ-2 в зависимости от типа и концентрации фитогормонов

Индукция каллусогенеза, %				
TDZ, мг/л				
0,5	1	1,5	2	2,5
50,5 ± 5,7	22,2 ± 6,4	50,2 ± 12,5	22,2 ± 6,4	67,1 ± 7,9
2,4-D, мг/л				
0,5	1	1,5	2	2,5
56,1 ± 6,6	50,5 ± 5,7	50,5 ± 5,7	67,1 ± 7,9	83,3 ± 9,6

Первичный каллус формировался в прикорневой зоне побега и на черешках листовых эксплантов. На питательных средах с TDZ каллус имел плотную структуру, а цветовой диапазон был от белого до светло-коричневого. На эксплантах побегов наблюдалась высокочастотная регенерация листьев, при этом развитие и рост самого побега отсутствовал (см. рисунок, а, б). Развитие побега отмечалось только на самой низкой концентрации TDZ — 0,5 мг/л, но наблюдалось его утолщение (см. рисунок, в).

В присутствии ауксина 2,4-D образовывался четко дифференцированный каллус средней плотности, белого цвета на низких концентрациях (0,5–1 мг/л) и с красными включениями на более высоких (1,5–2,5 мг/л). На концентрациях 0,5 и 1 мг/л формирование каллуса было незначительное, но отмечалось активное развитие сильно утолщенных корней (см. рисунок, г, д). У сформировавшегося первичного каллуса на концентрациях ауксина 1,5–2,5 мг/л отмечалось наличие почек ризогенеза (см. рисунок, е).



Структурно-морфологические особенности каллуса ВСЛ-2 в зависимости от типа и концентрации фитогормона (а — TDZ 2,5 мг/л; б — TDZ 1,5 мг/л; в — TDZ 0,5 мг/л; г — 2,4-D 0,5 мг/л; д — 2,4-D 1 мг/л; е — 2,4-D 2 мг/л), масштаб — 0,5 см

Таким образом, в результате проведенного исследования можно сделать вывод, что для активной индукции и нарастания первичного каллуса у клонового подвоя ВСЛ-2 можно рекомендовать синтетический фитогормон ауксин 2,4-D в концентрациях от 1,5 до 2,5 мг/л.

Литература

1. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? // *Frontiers in plant science*. 2019. Vol. 10. P. 536. DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.
2. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41, № 6. С. 496–508.
3. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.
4. El-Nameid A. R. Abd, El-kheir Z. A. Abo, Abdel-Hady M. S. Identification of DNA variation in callus derived from *Zingiber officinale* and anticoagulation activities of ginger rhizome and callus // *Bulletin of the National Research Centre*. 2020. Vol. 44. P. 103–108. DOI: 10.1186/s42269-020-0281-9.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-140

УСТОЙЧИВОСТЬ КОНСОРЦИУМА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМ МИКРООРГАНИЗМАМ*

RESISTANCE OF A CONSORTIUM OF LACTIC ACID BACTERIA TO OPPORTUNISTIC PATHOGENS

А. С. Фролова, И. С. Миленьева

Кемеровский государственный университет

A. S. Frolova, I. S. Milentyeva

Kemerovo State University

✉ frolova.anna.s@mail.ru

Аннотация

Был исследован консорциум на основе ацидофильной (невязкая и вязкая *Lactobacillus acidophilus*) и творожной (*Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis*) заквасок в соотношении 1 : 4. Консорциум устойчив к следующим условно-патогенным микроорганизмам: *Escherichia coli*, *Candida lipolit*, *Staphylococcus albus* и *Aspergillus niger*.

Abstract

We studied a consortium based on acidophilic (non-viscous and viscous *Lactobacillus acidophilus*) and curd (*Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*) starter cultures in a ratio of 1 : 4. The consortium is resistant to the following opportunistic pathogens: *Escherichia coli*, *Candida lipolit*, *Staphylococcus albus* and *Aspergillus niger*.

Молочнокислые бактерии (МКБ) представляют собой группу микробов, обычно выделяемых из ферментированных продуктов, которым уделяется повышенное внимание в качестве потенциальных пищевых консервантов из-за их антибактериальной активности, а также они обладают одним или несколькими органолептическими, технологическими, питательными или полезными для здоровья преимуществами.

Большинство полезных для здоровья МКБ относятся к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacteria*, но другие роды, такие как *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, также используются в качестве пробиотиков. Некоторые члены МКБ продуцируют бактериоцины и бактериоциноподобные вещества, определяемые как противомикробные пептиды или пептидные комплексы, которые проявляют антагонизм, в основном ингибируют рост грамположительных бактерий, включая гнилостные и патогенные микроорганизмы [1].

Целью работы является изучение устойчивости консорциума ацидофильной и творожной заквасок к условно-патогенным микроорганизмам.

В работе проводили исследования двух заквасок: ацидофильная (невязкая и вязкая *Lactobacillus acidophilus*) и творожная (*Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis*). Активация закваски: в 100 мл стерильного обезжиренного молока вносили сухую закваску, перемешивали. Скваживали при 38 °С до образования сгустка. На основе активированных культур готовили консорциум микроорганизмов при смешивании ацидофильной (АЗ) и творожной (ТЗ) заквасок в стерильном молоке в соотношении 1 : 4. Антимикробную активность определяли методом диффузии в лунки агар [2]. Инкубировали при 38 °С в течение 24 ч.

Результаты исследования устойчивости ацидофильной и творожной заквасок, а также их консорциума к условно-патогенным микроорганизмам приведены в таблице.

Устойчивость образцов к условно-патогенным микроорганизмам

Условно-патогенный микроорганизм	Диаметр зоны ингибирования, мм		
	АЗ	ТЗ	Консорциум
<i>Candida lipolit</i>	16,1 ± 0,9	12,9 ± 0,6	21,1 ± 1,1
<i>Aspergillus niger</i>	12,2 ± 0,6	7,3 ± 0,3	14,8 ± 0,7
<i>Staphylococcus albus</i>	13,0 ± 0,7	11,2 ± 0,6	13,2 ± 0,7
<i>Escherichia coli</i>	28,4 ± 1,7	20,4 ± 1,0	31,9 ± 1,8

* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы анализа в области прикладной биотехнологии» на базе ФГБОУ ВО «КемГУ».

По представленным данным видно, что закваски имеют высокую устойчивость к условно-патогенным микроорганизмам. АЗ устойчива к *Escherichia coli* (диаметр зоны ингибирования 28,4) и *Candida lipolit* (диаметр зоны ингибирования 16,1). ТЗ проявила устойчивость в отношении *Escherichia coli* (диаметр зоны ингибирования 20,4) и *Candida lipolit* (диаметр зоны ингибирования 12,9). При создании консорциума отметили повышение устойчивости к условно-патогенным микроорганизмам по сравнению с АЗ и ТЗ. Наибольшую устойчивость консорциум проявил к *Escherichia coli* (диаметр зоны ингибирования 31,9) и *Candida lipolit* (диаметр зоны ингибирования 21,1). Устойчивость консорциума к *Aspergillus niger* увеличилась в 1,52 раза по сравнению со средним значением устойчивости АЗ и ТЗ к *Aspergillus niger*. Устойчивость консорциума к *Staphylococcus albus* примерно равна значению АЗ (диаметр зоны ингибирования 13,2).

Литература

1. Cheng T., Wang L., Guo Z. et al. Technological characterization and antibacterial activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains for potential use as starter culture for cheddar cheese manufacture // *Food science and technology*. 2022. Vol. 42. P. e13022.
2. Khalil T., Okla M.K., Al-Qahtani W.H. et al. Tracing probiotic producing bacterial species from gut of buffalo (*Bubalus bubalis*), South-East-Asia // *Braz. J. Biol.* 2024. Vol. 84. P. e259094.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-141

БАКТЕРИИ-ЭНДОФИТЫ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ***ENDOPHYTIC BACTERIA AS PRODUCERS OF INDOLYL-3-ACETIC ACID**

А. С. Фролова, Д. Е. Колпакова, Н. Н. Хорошкина, М. В. Безъязыкова, К. В. Карчин

Кемеровский государственный университет

A. S. Frolova, D. E. Kolpakova, N. N. Khoroshkina, M. N. Bezyazykova, K. V. Karchin

Kemerovo State University

✉ frolova.anna.s@mail.ru

Аннотация

Из семян злаковых культур (*Avena sativa* L., *Triticum* L., *Secale cereale* L. и *Hordeum* L.) выделили 6 эндофитных бактерий, способных выживать на бедных почвах, устойчивых к засолению почв, гербицидам и инсектицидам. Штаммы синтезируют индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), концентрация от 4,49 до 9,00 мг/мл. Выделенные эндофиты являются перспективными для составления консорциума микроорганизмов, способного стимулировать рост растений.

Abstract

From the seeds of cereal crops (*Avena sativa* L., *Triticum* L., *Secale cereale* L. и *Hordeum* L.), 6 endophytic bacteria were isolated that can survive on poor soils that are resistant to salinity, herbicides and insecticides. The strains synthesize indolyl-3-acetic acid (IAA), concentration from 4,49 to 9,00 mg/ml. The isolated endophytes are promising for compiling a consortium of microorganisms capable of stimulating plant growth.

В последние годы внимание ученых привлекает составление консорциумов, в состав которых входят бактерии, стимулирующие рост растений. Бактерии-эндофиты обладают способностью продуцировать биологически активные соединения, которые способствуют росту растений и контролируют развитие фитопатогенных микроорганизмов, а также повышают устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам. Некоторые эндофиты могут стимулировать рост растений за счет растительного ауксина индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [1, 2].

Использование микроорганизмов может снизить потребность в применении химических удобрений, повысить устойчивость и толерантность растений к стрессу, а также способствовать экологизации сельского хозяйства. Следовательно, бактериальные эндофиты, стимулирующие рост растений, обладают большим потенциалом для улучшения роста и здоровья сельскохозяйственных культур в условиях устойчивого сельского хозяйства [3].

Целью работы является исследование способности эндофитов из злаковых сельскохозяйственных культур синтезировать ИУК.

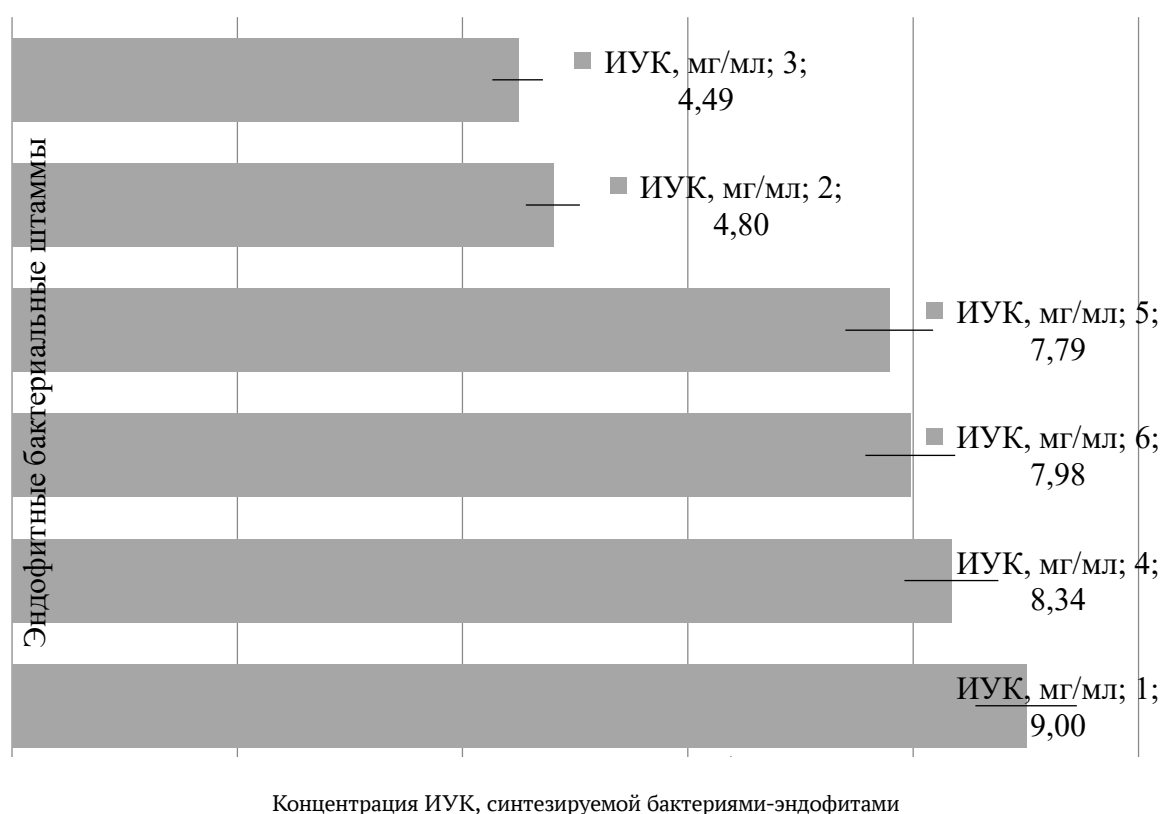
Выделение эндофитных бактерий осуществляли согласно методике R. Sa [4]. Чистые культуры последовательно выращивали в среде с минимальным содержанием солей (способность выживать на бедных почвах). Затем полученные культуры росли в среде с высоким содержанием соли (устойчивость к засолению почв). Потом изоляты выращивали в среде с добавлением гербицидов и инсектицидов (устойчивость к химическим препаратам). Концентрацию ИУК определяли по спектроскопическому методу [5].

Результаты исследования содержания ИУК, продуцируемой эндофитными бактериями, представлены на рисунке.

Все исследованные эндофиты способны к биосинтезу ИУК. Концентрация колеблется от 4,49 до 9,00 мг/мл. Из 6 штаммов наиболее высокую способность к синтезу ИУК показал изолят № 1 (9,00 мг/мл). Бактериальные эндофиты помогают стимулировать рост растений за счет производства гормонов роста растений, в том числе ИУК. В работе I. Naider с соавт. [6] по выделению эндофитов из риса получили 20 изолятов, способных продуцировать ИУК.

* Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Фундаментальные исследования по разработке биопестицидов, состоящих из экстремофильных и эндофитных микроорганизмов, для преодоления абиотического и биотического стресса сельскохозяйственными культурами в условиях Кемеровской области — Кузбасса» (FZSR-2023-0003).

© А. С. Фролова, Д. Е. Колпакова, Н. Н. Хорошкина, М. В. Безъязыкова, К. В. Карчин, 2023



Таким образом, выделенные из семян злаковых культур эндофитные бактерии являются перспективным объектом для изучения и составления консорциума микроорганизмов, способного стимулировать рост растений. В дальнейшем планируются исследования, направленные на создание биопрепарата комплексного действия по стимулированию роста и защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенов.

Литература

1. Fotina N. V., Emelianenko V. P., Vorob'eva E. E. et al. Contemporary Biological Methods of Mine Reclamation in the Kemerovo Region — Kuzbass // Food Processing: Techniques and Technology. 2021. Vol. 51 (4). P. 869–882.
2. Atuchin V. V., Asyakina L. K., Serazetdinova Y. R. et al. Microorganisms for bioremediation of soils contaminated with heavy metals // MDPI. 2023. Vol. 11 (4). P. 864.
3. Chaturvedi H., Singh V., Gupta G. Modeling the effect of decreasing dissolved oxygen on fish population survival in aquatic body in the presence of nutrients // J. Plant. Pathol. Microb. 2016. Vol. 7. P. 9.
4. Sa R., He S., Han D. et al. Isolation and identification of a new biocontrol bacteria against *Salvia miltiorrhiza* root rot and optimization of culture conditions for antifungal substance production using response surface methodology // BMC Microbiology. 2022. Vol. 22. P. 231.
5. Beraldo-Borrazzo J., Polonio J. C., Schoffen R. P. et al. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) plants obtained from seeds and from in vitro-regenerated somaclone // S. Afr. J. Bot. Vol. 142. P. 335–343.
6. Haider I., Ullah I., Khan S. U. et al. Characterization and cadmium detoxification dynamics of endophytic bacteria, isolated from rice plants // J. King. Saud. Univ. Sci. 2022. Vol. 34 (4). P. 101992.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-142

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРЧИ КУРИНОГО МЯСА С ПОМОЩЬЮ СЕНСОРА
НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА****DETERMINATION OF CHICKEN MEAT SPOILAGE USING A SENSOR
BASED ON A MAGNETITE NANOPARTICLES**

Д. Г. Хасанов, Е. А. Назарова

Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

D. G. Khasanov, E. A. Nazarova

SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

✉ khasanov@scamt-itmo.ru

Аннотация

Колориметрический сенсор на сероводород был разработан для контроля свежести куриного мяса. Принцип действия индикатора обусловлен способностью наночастиц магнетита необратимо связываться с H_2S , выделяемым при порче куриной грудки, и влиять на интенсивность окраски хромогена. Эта стратегия обеспечила надежную, экономичную и простую в использовании платформу для мониторинга качества мяса.

Abstract

A colorimetric sensor for hydrogen sulfide was developed to monitor the freshness of chicken meat. The operation principle of the indicator is due to the ability of magnetite nanoparticles to irreversibly bind to H_2S , released during spoilage of chicken breast, and to influence the color intensity of the chromogen. This strategy has provided a reliable, cost-effective, and easy-to-use platform for meat quality monitoring.

Определение и контроль срока годности скоропортящихся пищевых продуктов — сложная задача, поскольку он зависит от многих факторов. Такие составляющие, как качество сырья, уровень гигиены производственного процесса, температура хранения и т. д. невозможно полностью контролировать. Поэтому срок годности устанавливают с некоторым запасом из-за неоднородности качества сырья и различных условий при последующих транспортировке и хранении. Это является необходимой мерой предосторожности и означает, что в большинстве случаев мясо курицы можно употреблять даже после истечения номинального срока годности. Однако оно не может быть продано розничным продавцом и поэтому выбрасывается [1]. Как следствие, в настоящее время наблюдается значительный интерес к разработке относительно простого и быстрого аналитического метода обнаружения порчи пищевых продуктов, который позволял бы отслеживать их безопасность и увеличить устанавливаемый срок годности.

Сероводород, бесцветный газ с запахом тухлых яиц, обычно выделяется при размножении микроорганизмов из различных продуктов, богатых сероорганическими соединениями. С его помощью можно определить порчу не только мяса, но и яиц, фруктов и овощей. Таким образом, наличие или отсутствие сероводорода может служить маркером порчи пищевых продуктов или показателем их свежести [2]. Однако невозможность почувствовать запах в герметично упакованном продукте приводит к необходимости разработки сенсора, помещенного внутрь упаковки, чему и посвящена данная работа.

Предлагаемый сенсор основан на наночастицах магнетита, которые обладают пероксидазной активностью, катализируя процесс окисления красителя (ABTS) в присутствии перекиси водорода. Из-за этого происходит изменение цвета хромогена с прозрачного на зелено-голубой [3]. Если в среде присутствует сероводород, то он необратимо взаимодействует с наночастицами, окружая их и препятствуя проявлению пероксидазной активности. Поэтому изменения окраски красителя или не происходит при высокой концентрации сероводорода, или ее интенсивность будет слабой, что можно зафиксировать спектрофотометрически.

С повышением уровня жизни вопросы безопасности пищевых продуктов привлекают всеобщее внимание. Мясо является одним из самых скоропортящихся продуктов среди основных продуктов питания человека. Поэтому создание сенсора на основе магнетита для определения порчи куриного мяса является актуальной задачей. Следующим шагом исследований является разработка интегрированного в упаковку индикатора с целью внедрения его в промышленное производство.

Литература

1. Koskela J. et al. Monitoring the quality of raw poultry by detecting hydrogen sulfide with printed sensors // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015. Vol. 218. P. 89–96.
2. Ma L. et al. A new highly selective fluorescent probe design for visualizing hydrogen sulfide in food sample // *Tetrahedron Letters*. 2023. Vol. 122. P. 154508.
3. Zakharzhevskii M. et al. Test-system for bacteria sensing based on peroxidase-like activity of inkjet-printed magnetite nanoparticles // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, № 2. P. 313.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-143

ВЫЯВЛЕНИЕ РАЙОНОВ ИНТЕГРАЦИИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМЕ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ВЫХОДА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА**IDENTIFICATION OF TRANSGENE INTEGRATION REGIONS IN THE *ARABIDOPSIS THALIANA* GENOME, PROVIDING A HIGH YIELD OF THE RECOMBINANT PROTEIN**

Д. А. Цмокалюк, А. А. Загорская, П. А. Белавин, Е. А. Уварова, Е. В. Дейнеко

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

D. A. Tsmokalyuk, A. A. Zagorskaya, P. A. Belavin, E. A. Uvarova, E. V. Deineko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ dtsmok@gmail.com

Аннотация

В данных тезисах рассмотрены результаты применения метода геномных тихих гаваней для совершенствования растительных систем экспрессии. Коллекция трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* была охарактеризована по уровню выхода рекомбинантного белка, для растений с наибольшим выходом (до 0,8 % от общего растворимого белка) были определены последовательности прилежащих к трансгену районов генома.

Abstract

This work summarizes the results of genomic safe harbor method implementation for increasing recombinant protein yield in the transgenic plants. A collection of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants was assessed for recombinant protein accumulation level. For plants with superior accumulation level (up to 0,8 % of total soluble protein) adjacent to transgene genomic sequences were defined.

Растительные экспрессионные системы являются перспективной альтернативной платформой для получения рекомбинантных фармацевтических белков. Привлекательность этой платформы обеспечивается благоприятным сочетанием фолдинга по эукариотическому типу и корректными посттрансляционными модификациям целевого продукта при экономичных и масштабируемых условиях культивирования [1]. Основной проблемой растительных систем экспрессии является все еще низкий выход целевого продукта. Применение стандартного подхода увеличения копийности трансгена не представляется возможным по причине особенностей сайленсинга чужеродных генов в растительных клетках. Предлагается использовать подход «геномных тихих гаваней», применявшийся ранее при разработке методов генной терапии, для поиска геномных районов, в которых интеграция трансгена ведет к высокому выходу рекомбинантного белка и не вызывает нежелательные изменения фенотипа. Ранее подобный подход успешно применялся О. Dong с соавт. [2] для получения риса, обогащенного каротиноидами: исследователи проанализировали коллекцию подвергнутых радиационному мутагенезу растений, определили районы генома, перестройки в которых не ведут к нарушению фенотипа и утрате хозяйственно ценных признаков, с помощью Cas9 внедрили конструкцию, кодирующую белки биосинтеза витамина А, и оценили его накопление в полученных трансформантах [2].

Цель работы — охарактеризовать районы интеграции трансгена в геноме *Arabidopsis thaliana*, характеризующиеся высоким уровнем выхода целевого рекомбинантного белка. Задачи данной работы: получить методом агробактериальной трансформации коллекцию гомозиготных растений, несущих одиночную инсерцию гена *GFP*, оценить накопление рекомбинантного белка с помощью иммуноферментного анализа, клонировать и охарактеризовать последовательности прилежащих к трансгену районов генома для растений с максимальным выходом рекомбинантного белка.

Использование агробактериальной трансформации позволяет случайным образом переносить используемую генетическую конструкцию в растительный геном. В используемой нами генетической конструкции гены *GFP* и ген устойчивости к гигромидину имели собственные промоторы. Благодаря использованию отбора трансформантов по признаку устойчивости к антибиотику растения со встройками в низкоэкспрессируемые районы не отбирались нами для дальнейшей работы. Таким образом, мы получили коллекцию трансгенных растений с различными положениями встройки трансгена в растительном геноме, дающую возможность связать накопление рекомбинантного белка с местом интеграции соответствующего гена.

В результате анализа наличия расщепления в потомстве по признаку устойчивости к гигромицину при самоопылении нами было получено и отобрано 15 гомозиготных растений с единичной встройкой трансгена. Получив данные по накоплению рекомбинантного белка, мы определили растение с максимальным уровнем его выхода. С применением инвертированной ПЦР клонировали прилежащие к трансгену геномные районы, определили их последовательность и провели выравнивание на геном.

Установлено, что в растении с максимальным выходом рекомбинантного GFP белка интеграция трансгена произошла в район гена *galactose oxidase*. В дальнейшем планируется получить данные о месте встройки для большего числа растений *A. thaliana* и оценить сохранение фенотипических характеристик у клеточных культур, полученных из трансгенных растений с высоким уровнем выхода рекомбинантного белка.

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. P. 842. DOI: 10.3390/plants9070842.
2. Dong O. X., Yu S., Jain R. et al. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. // *Nat. Commun. Springer US*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–10. DOI: 10.1038/s41467-020-14981-y.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-144

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВОГО АЛЛЕЛЬНОГО ВАРИАНТА ГЕНА *VRN-D1* У *AEGILOPS TAUSCHII* COSS***IDENTIFICATION OF A NEW ALLELIC VARIANT OF THE *VRN-D1* GENE IN *AEGILOPS TAUSCHII* COSS**

Г. Ю. Чепурнов, А. Г. Блинов, Н. П. Гончаров

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

G. Yu. Chepurnov, A. G. Blinov, N. P. Goncharov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ grigory.tchepurnov@yandex.ru

Аннотация

В работе охарактеризованы 15 образцов *Aegilops tauschii* по типу развития. При помощи ПЦР-анализа и секвенирования у всех образцов была исследована структура гена *Vrn-D1*. Обнаружено три аллельных варианта: (i) интактный, (ii) с делецией 5437 п. н. в первом интроне и (iii) ранее не описанный аллельный вариант с делецией 3273 п. н. в первом интроне. Показано, что яровые растения *Ae. tauschii* формируются благодаря новому варианту гена *Vrn-D1*.

Abstract

The paper characterizes 15 accessions of *Aegilops tauschii* in growth habit. Using PCR analysis and sequencing, the structure of the *Vrn-D1* gene was studied in all samples. Three allelic variant gene were found: (i) intact, (ii) with a 5437 bp deletion in the first intron and (iii) a previously undescribed allelic variant with a 3273 bp deletion in the first intron. It is shown that spring plants *Ae. tauschii* is formed due to a new variant of the *Vrn-D1* gene.

Яровизация представляет собой воздействие на растения низких положительных температур, инициирующих формирование колоса. Это необходимо для защиты флоральных меристем озимых растений от повреждения отрицательными температурами зимой. Тем не менее яровые растения, не требующие воздействия низких температур для инициации цветения, оказались более приспособлены для возделывания в континентальных районах средних широт (от 40° до 60° с. ш.) [1]. Генетический контроль реакции на яровизацию злаковых растений обусловлен генами *Vrn*, действующими в едином каскаде, начало которого инициируется благодаря экспрессии генов локуса *VRN-1* в листьях [2]. Аллельные варианты этого гена хорошо исследованы у культурных сортов рода *Triticum*, чего нельзя сказать о диких сородичах и донорах элементарных геномов полиплоидных пшениц. Это снижает возможный пул ценных аллелей, способствующих созданию новых сортов при проведении селекционного процесса. Вид *Aegilops tauschii*, донор D генома полиплоидных пшениц, включает в себя яровые образцы. Исследование генетических механизмов, лежащих в основе формирования таких фенотипов, может помочь селекционерам и генетикам при создании сортов пшеницы, лучше адаптированных к определенным условиям возделывания.

Тип развития оценивали относительно контрольных образцов. Всего из 15 образцов 11 имели яровой тип развития и 4 — озимый тип развития (см. таблицу).

Тип развития исследуемых образцов *Ae. tauschii*

Тип развития образцов	Название образцов
Яровые (n = 11)	KU-20-6 (яровой контроль), KU-2002, K-864, K-608, C21-51-43, KU-2009, C21-5144, C21-5118, C21-4030, C21-5112, K-992
Озимые (n = 4)	K-1740 (озимый контроль), КТ-120-15, K-1657, C21-51-29

У всех 15 образцов *Ae. tauschii* был проведен анализ структуры первого интрона гена *Vrn-D1*. Для определения наличия интактного интрона у озимых образцов был проведен ПЦР-анализ со специфическими праймерами и получен ПЦР-продукт длиной 998 п. н., что говорит о наличии у них интактного интрона (рис. 1, А). У яровых образцов был проведен ПЦР-анализ со специфическими праймерами, разработанными в предыдущем

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-16-20026.

© Г. Ю. Чепурнов, А. Г. Блинов, Н. П. Гончаров, 2023

исследовании [3]. ПЦР-продукт длиной 747 п. н., который свидетельствует о наличии делеции 5437 п. н. в первом интроне гена *Vrn-D1* (что обуславливает яровой тип развития), был получен у всех образцов кроме ярового образца К-992 (рис. 1, Б).

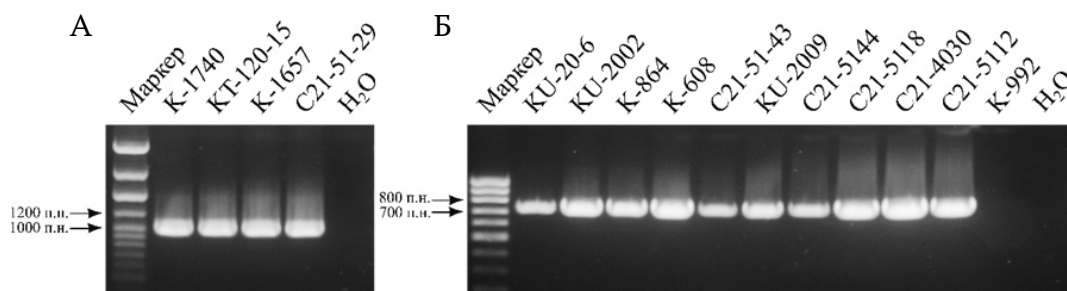


Рис. 1. А — электрофорез продуктов ПЦР участка первого интрона гена *Vrn-D1* у озимых образцов. Б — электрофорез продуктов ПЦР участка первого интрона гена *Vrn-D1* у яровых образцов

Так как К-992 не содержал ранее описанной делеции, мы использовали праймеры для амплификации первого интрона гена *Vrn-D1* у этого образца. Полученный ПЦР-продукт секвенировали по Сэнгеру. В результате секвенирования была установлена делеция 3273 п. н. (рис. 2).

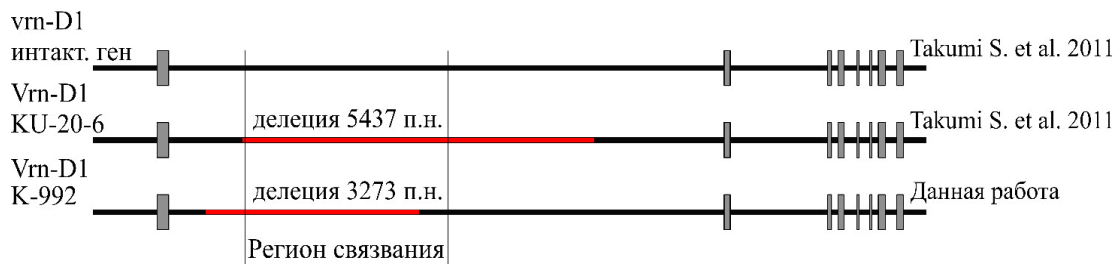


Рис. 2. Положение делеций первого интрона трех аллельных вариантов гена *Vrn-D1* у *Ae. tauschii*. Серыми прямоугольниками изображены экзоны, черными полосами — интроны, красными полосами — делеции. Регион связывания — последовательность, содержащая сайты связывания с белком-репрессором GRP-7, делеции в которой формируют яровой тип развития у растений пшеницы и ячменя [3]

Предположительно, местоположение делеции в первом интроне гена *Vrn-D1* у К-992 могло обуславливать экспрессию этого гена в листьях без предварительной яровизации, поэтому исследовали уровень его экспрессии. Было установлено, что уровень экспрессии нового аллеля *Vrn-D1* у К-992 достоверно отличался от экспрессии интактного аллеля озимого образца К-1740, начиная с 3-й недели развития вплоть до колошения (рис. 3).

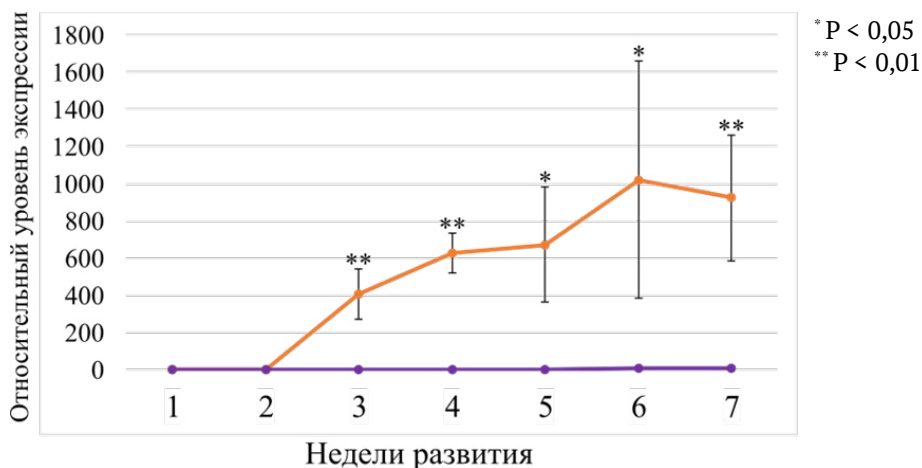


Рис. 3. Изменение относительного уровня экспрессии образцов К-992 (обозначен оранжевым) и К-1740 (обозначен фиолетовым). Данные для всех выборок выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$). Для проверки статистической значимости использовали t-критерий Стьюдента

Новый аллель гена *Vrn-D1*, обнаруженный нами у К-992, может помочь в понимании генетических механизмов, ответственных за период формирования соцветий злаковых растений.

Литература

1. Flood R. G., Halloran G.M. Genetics and Physiology of Vernalization Response in Wheat // In Advances in Agronomy. 1986. Vol. 39. P. 87–125.
2. Chen A., Dubcovsky J. Wheat TILLING Mutants Show That the Vernalization Gene *VRN1* Down-Regulates the Flowering Repressor *VRN2* in Leaves but Is Not Essential for Flowering // PLoS. 2012. Vol. 8. P. 245–257.
3. Takumi S., Nishioka E., Morihito et al. Natural variation of morphological traits in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss. // Breed. Sci. 2009. Vol. 59. P. 579–588.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-145

**ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА *MONARDA CITRIODORA* (CERV. EX LAG.)
НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ *DROSOPHILA MELANOGASTER*****EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF *MONARDA CITRIODORA* (CERV. EX LAG.)
ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF *DROSOPHILA MELANOGASTER***А. И. Черная¹, О. Н. Антосяк¹, Е. В. Болотник²¹ Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург² Ботанический сад УрО РАН, ЕкатеринбургA. I. Chernaia¹, O. N. Antosyuk¹, E. V. Bolotnik²¹ Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg² Botanical Garden UB RAS, Ekaterinburg

✉ antosuk-olga@mail.ru

Аннотация

В ходе тестирования экстракта *Monarda citriodora* на примере модельного объекта *Drosophila melanogaster* было обнаружено его влияние на репродуктивную систему, а именно положительное влияние на половую активность, негативное влияние на среднюю индивидуальную плодовитость и изменение регулируемой клеточной гибели в яичниках самок.

Abstract

During testing of the *Monarda citriodora* extract on the example of a model object *Drosophila melanogaster*, its effect on the reproductive system was found, namely, a positive effect on sexual activity and a negative effect on average individual fertility and an alteration in regulated cell death in the ovaries of females.

Экстракты лекарственных растений активно тестируются в качестве вспомогательных препаратов при лечении, например, противоопухолевыми препаратами. При совместном применении экстракты некоторых растений способны оказывать протекторные свойства: понижать цитотоксичность, снижать уровень повреждения генетического материала. Интересным для изучения является вид *M. citriodora*, относящийся к роду *Monarda*, семейству *Lamiaceae*. Это успешно интродуцированный вид, происходящий из Северной Америки (США, Мексика). В литературе описаны различные свойства *M. citriodora*: противогрибковые [1] и антиоксидантные [2], но протекторные свойства изучены недостаточно полно. Кроме того, существуют данные, свидетельствующие об изменении биохимического состава экстрактов в зависимости от места произрастания растений, что может оказывать влияние на протекторные свойства экстракта [3].

В работе использовали лабораторную линию Oregon-R *Drosophila melanogaster*. Введение экстракта растения производили методом *per os* путем культивирования на питательных средах. В ходе работы изучали три экспериментальные группы: контрольную группу; группу, выращенную на питательной среде с внесением 5%-го экстрагента (EtOH 70 %) и группу, выращенную на питательной среде с внесением 5%-го экстракта *M. citriodora*. Растение *M. citriodora* выращивали в Ботаническом саду УрО РАН, высушивали в хорошо проветриваемом помещении, измельчали до размера частиц 1 мм, экстрагировали EtOH 70 %.

Для оценки влияния экстракта на репродуктивную систему применяли следующие методы: анализ средней индивидуальной плодовитости особей и эмбриональной летальности потомства F₁, оценка половой активности и определение наличия регулируемой клеточной гибели (РКГ) в яичниках самок. Анализ плодовитости и эмбриональной летальности осуществляли, исследуя 25 пар особей в каждой экспериментальной группе в течение 10 дней. Оценку половой активности производили в 10 виалах, где попарно содержали самок и самцов и в течение двух часов фиксировали подходы самца к самке, этапы ритуала ухаживания, завершение ритуала (копуляцию). Цитотоксический эффект в виде наличия РКГ определяли в яичниках самок: производили диссекцию яичников, окраску акридиновым оранжевым красителем и бромистым этидием в соотношении 1 : 1 и анализировали при помощи микроскопа Leica DM500 B.

Особь, выращенные на питательной среде с внесением 5%-го этанольного экстракта *M. citriodora*, характеризуются высокой половой активностью. Количество подходов самца к самке возросло на 62 % относительно

контрольной выборки, количество копуляций возросло на 20 %. При этом наблюдали снижение средней индивидуальной плодовитости на 42 % относительно контрольной выборки (рис. 1).

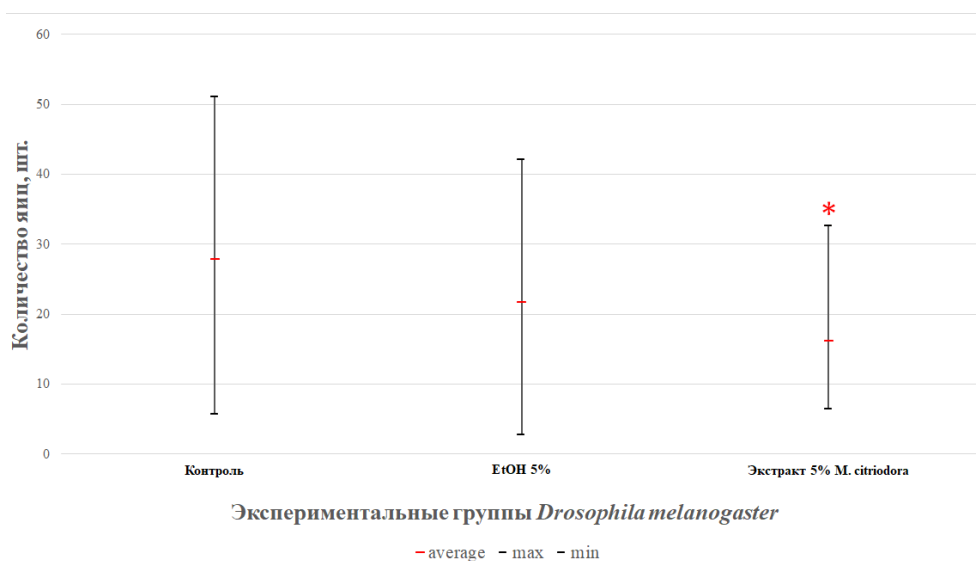


Рис. 1. Средняя индивидуальная плодовитость различных экспериментальных групп *Drosophila melanogaster*. Знаком * обозначены значения, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей в контрольной группе при $p < 0,05$

При анализе РКГ в контрольных точках 1 и 2 овариол яичников не обнаружили увеличение частоты встречаемости РКГ относительно контрольной выборки. Атрофия яичников не была зарегистрирована (рис. 2), но были обнаружены единичные случаи наличия РКГ на поздних этапах оогенеза в экспериментальной группе, выращенной в питательной среде с внесением экстрагента.

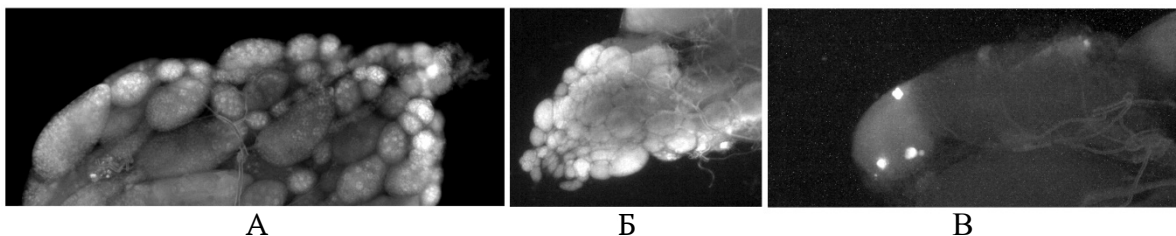


Рис. 2. Овариолы яичников самок различных экспериментальных групп *Drosophila melanogaster*. А — контрольная группа; Б — экстрагент EtOH 70 %; В — экстракт 5 % *M. citriodora*

Таким образом, активность самцов при ритуале ухаживания не приводит к увеличению показателя плодовитости особей, что, в свою очередь, не является следствием интенсификации регулируемой клеточной гибели в овариолах яичников у самок.

Литература

1. Bishop C. D., Thornton I. B. Evaluation of the antifungal activity of the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post-harvest pathogens // *Journal of Essential Oil Research*. 1997. Vol. 9. P. 77–82.
2. Dorman H. J. D., Deans S. G. Chemical composition, antimicrobial and *in vitro* antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Pelargonium* sp. and *Thymus zygis* oils // *Journal of Essential Oil Research*. 2004. Vol. 16. P. 145–150.
3. Lawson S. K., Satyal P., Setzer W. N. The Volatile Phytochemistry of *Monarda* Species Growing in South Alabama // *Plants*. 2021. Vol. 10. P. 482.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-146

**СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С,
ПОЛУЧЕННОЙ В СИСТЕМЕ *BACILLUS MOJAVENSIS* ПРИ ГЛУБИННОМ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПОЛУПРОМЫШЛЕННОМ ФЕРМЕНТЕРЕ***

**DAILY DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE C
OBTAINED IN THE *BACILLUS MOJAVENSIS* SYSTEM DURING SUBMERGED
CULTIVATION IN A SEMI-INDUSTRIAL FERMENTER**

В. Ю. Чиркова¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}, И. Ю. Евдокимов¹

¹Алтайский государственный университет, Барнаул

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

V. Yu. Chirkova¹, D. N. Shcherbakov^{1,2}, I. Yu. Evdokimov¹

¹Altai State University, Barnaul

²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ varvara.chirkova@gmail.com

Аннотация

В результате опытного глубинного культивирования нового штамма-продуцента рекомбинантной фосфолипазы С в системе *Bacillus mojavensis* в условиях полупромышленного 250-литрового биореактора был получен ферментный препарат с максимальной фосфолипазной активностью 307,35 ед. акт/мл через 8 ч наработки при 37 °С.

Abstract

As a result of experimental deep cultivation of a new strain-producer of recombinant phospholipase C in the *Bacillus mojavensis* system in a semi-industrial 250-liter bioreactor, an enzyme preparation was obtained with a maximum phospholipase activity of 307.35 units/ml after 8 h of operation at 37 °C.

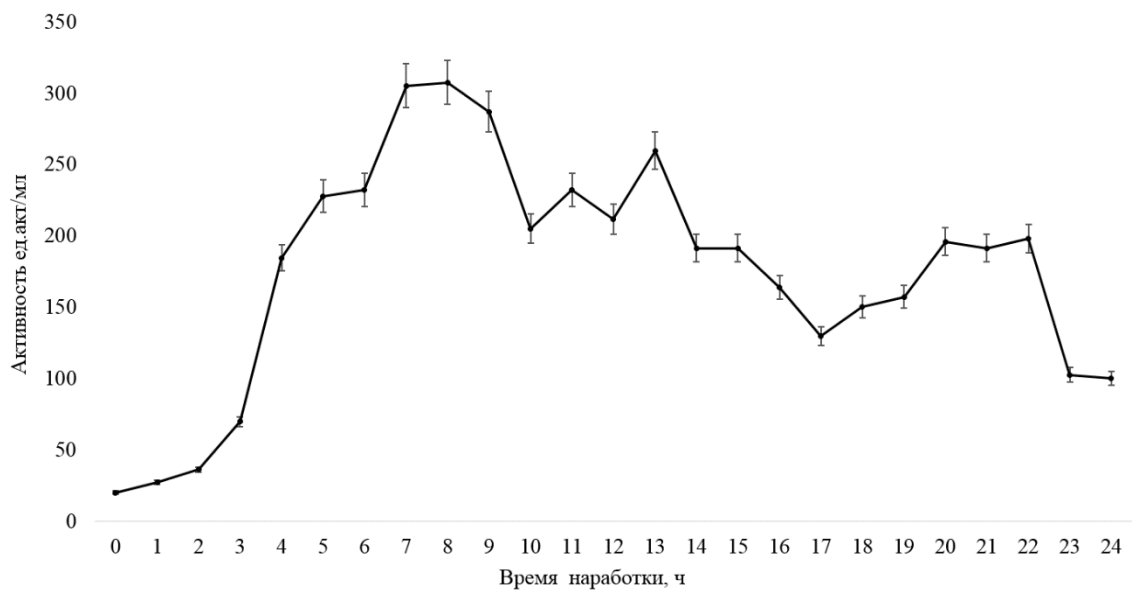
Фосфолипаза С (КФ 3.1.4.3) — фермент класса гидролаз, катализирует расщепление фосфолипидов до диацилглицеридов и полярных фосфатсодержащих групп. Данный фермент востребован за счет возможности практического применения в процессах рафинирования масел, получения биодизельного топлива, ускорения сроков созревания сыров, применения в качестве эмульгатора в молочной и хлебопекарной промышленности и т. д. Поскольку российских коммерческих препаратов фосфолипазы С на рынке нет, актуальной задачей является совершенствование технологии промышленного культивирования фермента. В данном исследовании было проведено глубинное культивирование штамма-продуцента в опытно-промышленном ферментере и определено оптимальное время наработки.

В качестве продуцента фосфолипазы С был использован рекомбинантный штамм *B. mojavensis* BDV-1/PLC6H, полученный электропорацией плазмидой pBSU-PLC6H штамма реципиента *B. mojavensis* BDV-1. Для проведения циклов культивирования посевной материал готовили в колбах с питательной средой УТх2 в объеме 500 мл (рН = 7,2). В качестве селективного фактора в среду добавляли раствор хлорамфеникола (50 мкл/100 мл среды). Культивирование проводили в 250-литровом ферментере (ООО «Сторге», Россия) с использованием среды следующего состава (г/л): меласса — 25, кукурузный экстракт — 12,5, дрожжевой экстракт — 1, пептон — 0,5, MgSO₄ — 0,25, MnSO₄ — 0,03, CoCl₂ — 0,046, CaCl₂ — 1, софэксил — 0,5, вода водопроводная — до 1 л, рН = 6,8–7,0. Продолжительность и температура культивирования — 24 ч при 37 °С.

В процессе культивирования отбирались аликвоты культуральной жидкости, проточным центрифугированием при 15000 об/мин отделяли надосадочную жидкость, в которой спектрофотометрическим методом определяли фосфолипазную активность, используя в качестве субстрата п-нитрофенил-фосфорилхолин по методике [1].

Максимальная фосфолипазная активность при наработке в 250 л аппарате была достигнута к 8 ч роста и составила 307,4 ед. акт/мл (см. рисунок). Дальнейшее культивирование не приводило к росту активности.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Управления Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям.



Суточная динамика изменения фосфолипазной активности (ед. акт/мл) надосадочной жидкости при наработке в 250-литровом ферментере

Литература

1. Kurioka S., Matsuda M. Phospholipase C assay using p-Nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 75 (1). P. 281–289.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-147

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО БЕЛКА DKK-1 ПРИ СПОНДИЛОАРТРИТАХ***COLORIMETRIC APTAMER-BASED TEST SYSTEMS FOR THE DETECTION OF SERUM DKK-1 PROTEIN IN SPONDYLOARTHRITIS**Е. А. Шатунова¹, М. А. Королев², М. А. Воробьева¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск²Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии, НовосибирскE. A. Shatunova¹, M. A. Korolev², M. A. Vorobyeva¹¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk²Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk

✉ lizashatunova@yandex.ru

Аннотация

Перспективным подходом к определению уровня диагностически значимых сывороточных белков является создание тест-систем на основе аптамеров. В рамках данной работы была получена серия новых ДНК-аптамеров к биомаркеру костного метаболизма DKK-1. На основе аптамеров и специфичных к DKK-1 антител были сконструированы и протестированы несколько вариантов сэндвич-систем для гетерофазной колориметрической детекции DKK-1. Выбран оптимальный вариант системы, показана его применимость для определения уровня DKK-1 в образцах сыворотки от пациентов со спондилоартритами.

Abstract

A promising approach to measuring the level of diagnostically significant serum proteins is the development of test systems based on aptamers. In this work, we generated a series of new DNA aptamers for the bone metabolism biomarker DKK-1. Several sandwich systems based on aptamers and DKK-1-specific antibodies for heterogeneous colorimetric detection of DKK-1 were developed and tested. The optimal aptamer/antibody system have shown its suitability for measuring DKK-1 levels in serum samples from patients with spondyloarthritis.

Белок DKK-1 — ингибитор Wnt-сигнального пути активации остеобластов, является одним из регуляторов метаболизма костной ткани. Его рассматривают в качестве перспективного биомаркера для диагностики целого ряда заболеваний, в том числе структурных повреждений при спондилоартритах. В связи с этим существует потребность в создании новых, надежных и доступных методов определения сывороточного уровня DKK-1, совместимых с современной клинической практикой. Тест-системы на основе аптамеров, коротких одноцепочечных РНК или ДНК, связывающих свои молекулы-мишени с высоким сродством и селективностью, являются многообещающей альтернативой системам на основе антител, в том числе иммуноферментному анализу (ИФА). Цель данной работы — получение новых аптамеров к DKK-1 и конструирование систем детекции на их основе.

ДНК-аптамеры к DKK-1 были получены методом селекции *in vitro*. Для этого использовали комбинаторную оцДНК-библиотеку, содержащую чередования пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов в комбинаторной области. Такой подход позволяет повысить вероятность отбора более эффективных для связывания структур. Белок-мишень иммобилизовали на магнитные частицы. Каждый раунд отбора включал следующие стадии: «негативную» селекцию для удаления из пула ДНК, связывающих частицы, инкубацию библиотеки с DKK-1, удаление несвязавшихся молекул, элюцию пула связавшихся ДНК, амплификацию в ПЦР. После 4 раундов отбора были проведены оценка аффинности обогащенной библиотеки и секвенирование на платформе MiSeq Illumina.

На основе данных секвенирования была сформирована и химически синтезирована серия наиболее часто представленных в библиотеке кандидатных аптамеров. Исследование их связывания с белком позволило выявить четыре аптамера, способные специфично связывать белок-мишень с константами диссоциации в наномолярном диапазоне. На основе данных о предполагаемой вторичной структуре аптамеров были предложены и затем опробованы варианты минимизации их нуклеотидной последовательности с удалением фрагментов, не влияющих на связывание с белком DKK-1.

* Работа выполнена в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1 и государственного задания НИИКЭЛ-филиала ИЦиГ СО РАН № FWNR-2023-000.

© Е. А. Шатунова, М. А. Королев, М. А. Воробьева, 2023

С использованием полученного нами аптамера DK4, литературного ДНК-аптамера TD10 [1] и антител к ДКК-1 были сконструированы и протестированы в модельных условиях три варианта колориметрических микропланшетных сэндвич-систем детекции: аптамер/аптамер, антитело/аптамер и аптамер/антитело. Было показано, что только вариант с иммобилизованным на поверхности планшета аптамером и конъюгатом антитела к ДКК-1 с пероксидазой хрена в качестве репортерного компонента подходит для количественного определения концентрации ДКК-1. Для данной системы были дополнительно оптимизированы условия каждой стадии анализа для повышения чувствительности и снижения фонового сигнала.

С использованием пар аптамер/антитело были проанализированы образцы сывороток от пациентов с анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом. Для сравнения был использован коммерческий ИФА-набор для определения ДКК-1. Было показано, что значения концентрации ДКК-1, полученные с использованием пар аптамер/антитело, находятся в характерном для уровней данного белка в сыворотке диапазоне и сравнимы с данными ИФА.

Таким образом, была показана работоспособность тест-систем на основе ДНК-аптамеров DK4 и TD10. Данный подход совместим с рутинными методами современной клинической лабораторной диагностики, не требует дорогостоящего оборудования. Кроме того, возможность химического синтеза аптамеров и их более высокая по сравнению с антителами стабильность в перспективе обеспечат лучшую воспроизводимость результатов, что особенно важно при долговременных многолетних исследованиях. Все это позволяет сделать вывод о хорошем потенциале применения предложенной нами системы для определения ДКК-1 при диагностике и мониторинге течения спондилоартритов.

Литература

1. Zhou Y., Li W., Tseng Y. et al. Developing slow-off dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma // *Talanta*. 2019. Vol. 194. P. 422–429.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-148

БИОКАТАЛИЗ ДРЕВЕСНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕДИЦИНСКОГО И ПИЩЕВОГО НАЗНАЧЕНИЯ*

BIOCATALYSIS OF WOOD MATERIALS FOR THE PRODUCTION OF CELLULOSE FOR MEDICAL AND FOOD PURPOSES

А. Р. Шевченко, К. А. Майорова

Северный федеральный университет им. М. В. Ломоносова, Архангельск

A. R. Shevchenko, K. A. Mayorova

Lomonosov Northern Federal University, Arkhangelsk

✉ schewchenko.aleks@yandex.ru

Аннотация

Развитие молекулярной биологии в продуктивности систем ферментов позволило значительно продвинуться в переработке возобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Химико-лесной комплекс рассматривается как фундамент для внедрения биокаталитических технологий с получением новых продуктов: пребиотиков на основе древесных олигосахаридов и биомодифицированной целлюлозы пищевого или медицинского качества.

Abstract

The development of molecular biology in the productivity of enzyme systems has made it possible to make significant progress in the processing of renewable cellulose-containing raw materials. The Forest Products Industry is considered as a foundation for the introduction of biocatalytic technologies with the production of new products: prebiotics based on wood oligosaccharides and biomodified cellulose of food or medical quality.

Возможность внедрения полисахаридов целлюлозосодержащего сырья с применением технологий конверсии в промышленное производство волнует исследователей уже не первое десятилетие. Прогрессивным направлением экологически чистой деструкции является применение высокоэффективных биокатализаторов. Химико-лесной комплекс имеет потенциал внедрения подобных биотехнологических разработок, актуальность которых в условиях импортозамещения обуславливает ферментативную переработку технических целлюлоз с получением новых продуктов медицинского и пищевого назначения на территории России. В качестве растворимых продуктов биодеструкции сложного комплекса полисахаридов технических целлюлоз образуются моно- и дисахариды, которые являются доброкачественной средой для микробиологического получения различных видов органических соединений, таких как спирты, кислоты и аминокислоты [1]. С другой стороны, исследователи проявляют интерес к разработке пребиотиков на основе продуктов деструкции целлюлозы, ксилана и маннана: целлоолигосахаридов (COS), ксилоолигосахаридов (XOS) и манноолигосахаридов (MOS). Данные непереварируемые соединения представляют особый тип пребиотиков, которые являются источником углерода и энергии для бактерий, обитающих в нижних отделах желудочно-кишечного тракта [2, 3]. Также контролируемый ферментативный катализ технических целлюлоз позволяет получить биомодифицированные полисахаридные комплексы с определенным набором характеристик и свойств, которые соответствуют нормативным параметрам товарных микрокристаллических целлюлоз, а в качестве перспективного и нового направления использования растительных полимеров данных материалов выделяется получение высокопористых каркасов, криогелей и биоаэрогелей [4].

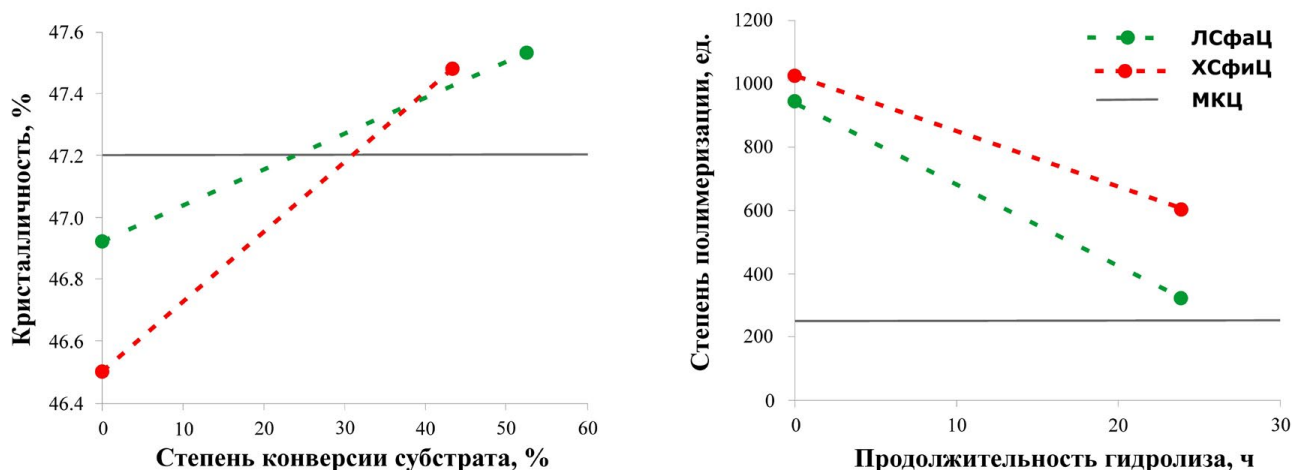
Для оценки возможности получения продуктов медицинского и пищевого назначения из древесного сырья проводили биокатализ образцов промышленных беленых сульфатных листовых (ЛСфаЦ, 72 % целлюлозы, 22 % ксилана) и беленых сульфитных хвойных (ХСфиЦ, 79 % целлюлозы, 9 % маннана, 7 % ксилана) полуфабрикатов. Биокатализаторами являлись коммерческие ферментные препараты, продуцируемые штаммами гриба *P. verruculosum*. Состав комплекса представлен карбогидразами с широким спектром субстратных активностей (по КМЦ, глюкану, ксилану, МКЦ, п-НФ-целлобиозиду, п-НФ-глюкопиринозиду, маннану) [5]. Ферментативную деструкцию проводили в биореакторе Biostat A Plus с концентрацией субстрата 10 %, при расходе ферментов 10 АФБ/г а.с.с., 50 °С, pH 5,0, в течение 24 ч. Количественный анализ растворимых продуктов проводили с исполь-

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-20136.

© А. Р. Шевченко, К. А. Майорова, 2023

зованием хроматографической системы высокого давления Agilent 1200. Характеристику биомодифицированных остатков осуществляли согласно методам, описанным в работе [4].

По результатам биоконверсии степень деструкции субстрата достигла значения 52,7 % ЛСфаЦ и 43,5 % ХСфиЦ. Большую часть из сахаров различной молекулярной массы составила глюкоза с концентрацией 36,3 г/л для сульфатных и 37,1 г/л для сульфитных образцов, в дополнение листовенные полуфабрикаты содержали 15 г/л ксилозы. При этом концентрация олигосахаридов, состоящих из 3 и более звеньев, в гидролизатах составила 6,5 г/л в ЛСфаЦ и 13,7 г/л в ХСфиЦ, с преобладанием олигомеров и декстринов из целлюлозы (4,5 г/л и 10,4 г/л). При этом в процессе биокатализа за счет удаления значительной части основных нелинейных гетерополисахаридов, а также одновременного действия эндо- β -1,4-глюканаза на аморфные участки целлюлозы кристалличность образцов увеличивается, а СП снижается (см. рисунок).



Кристалличность и степень полимеризации нерастворимых продуктов биокатализа технических целлюлоз

В составе биомодифицированных остатков преобладает целлюлоза (> 87 %), что в совокупности с данными по кристалличности и СП позволяет рассматривать данный материал как альтернативу техническим МКЦ.

Таким образом, новым вектором развития химико-лесного комплекса может служить получение линейки новых продуктов на основе полисахаридов, подверженных биокаталитическому воздействию. Олигосахариды растительной природы с различной длиной цепи и типом мономера являются перспективными пребиотиками, а биомодифицированная целлюлоза, полученная ферментативным способом, может быть конкурентноспособной среди существующих на рынке технических видов МКЦ.

Литература

1. Guzman-Puyol S., Benítez J. J., Heredia-Guerrero J. A. Sustainable Bio-Based Polymers: Towards a Circular Bioeconomy // *Polymers*. 2021. Vol. 14 (1). P. 22.
2. Zhong C. et al. Short-chain cello-oligosaccharides: intensification and scale-up of their enzymatic production and selective growth promotion among probiotic bacteria // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020. Vol. 68. P. 8557–8567.
3. Rudjito R. C. et al. Arabinoxylan source and xylanase specificity influence the production of oligosaccharides with prebiotic potential // *Carbohydrate Polymers*. 2023. P. 121233.
4. Shevchenko A. R. et al. Production of biomodified bleached kraft pulp by catalytic conversion using *Penicillium verrucosum* enzymes: composition, properties, structure, and application. *Catalysts*. 2023. Vol. 13 (1). P. 103.
5. Зоров И. Н., Рожкова А. М., Кержнер М. А., Сеницын А. П. Кормовые ферментные препараты нового поколения. Основные свойства и опыт применения. 2018. С. 79–81.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-149

**РАЗРАБОТКА НОВОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНЬЮГАТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ*****DEVELOPMENT OF A NEW MOLECULAR CONJUGATE AS A POTENTIAL PHOTOSENSITIZER
OF NEW GENERATION**О. В. Шевченко¹, Н. Г. Плехова¹, М. А. Медков²¹*Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток*²*Институт химии ДВО РАН, Владивосток*O. V. Shevchenko¹, N. G. Plekhova¹, M. A. Medkov²¹*Pacific State Medical University, Vladivostok*²*Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok*

✉ tarakovaolga@gmail.com

Аннотация

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) основан на реакции фотоактивации светочувствительных веществ (фотосенсибилизаторов, ФС) источниками излучения с последующим разрушением клеток опухоли активными формами кислорода. Фотосенсибилизаторы первого поколения имеют ряд недостатков, которые значительно ограничивают клиническое применение. В настоящем исследовании разрабатывается способ синтеза молекулярного конъюгата нового поколения на основе широко применяемого природного вещества порфириновой природы — Хлорина е6. Методами физико-химического исследования определены параметры нового соединения. В рамках модельного эксперимента установлено, что 20 мин воздействия красного света с длиной волны 645 нм на конъюгат вызывает эффективное увеличение интенсивности флуоресценции, позволяющее контролируемо осуществлять воздействие источником излучения. Показано, что через 4 сут после контакта с конъюгатом и облучения процент нежизнеспособных клеток составляет $81,5 \pm 4,1$ %.

Abstract

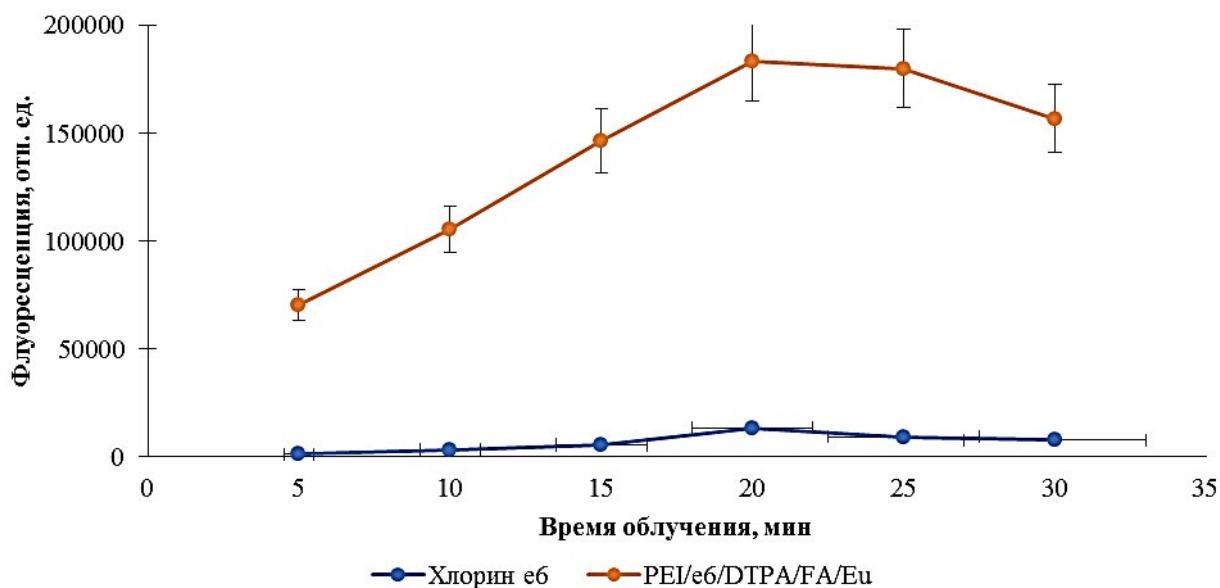
The method of photodynamic therapy (PDT) is based on the reaction of photoactivation of light-sensitive substances (photosensitizers, PS) by radiation sources with subsequent destruction of tumor cells by reactive oxygen species. First-generation photosensitizers have a number of disadvantages that significantly limit their clinical application. In the present study, a method is being developed for the synthesis of a new generation molecular conjugate based on a widely used natural substance of porphyrin nature is Chlorin e6. The parameters of the new compound were determined by the methods of physicochemical research. As part of a model experiment, it was found that a 20-minute exposure of red light with a wavelength of 645 nm to the conjugate causes an effective increase in the fluorescence intensity which makes it possible to control the exposure of a radiation source. It was shown that after 4 days of contact of cells with the conjugate and irradiation the percentage of non-viable cells was $81,5 \pm 4,1$ %.

Одним из современных методов разработки фотосенсибилизаторов нового поколения является конъюгированное взаимодействие химической и биологической молекул [1]. В процессе работы впервые синтезирован растворимый в физиологической среде молекулярный конъюгат состава полиэтиленимин/Хлорин е6/диэтилентриаминпентауксусная кислота/фолиевая кислота/европий (PEI/e6/DTPA/FA/Eu). С применением современных физико-химических методов анализа охарактеризованы состав, структура и морфология поверхности нового соединения. В спектре поглощения отмечены две значимые области: полоса Core — интенсивная, расположена в области 380–420 нм, и несколько менее интенсивная полоса в области 500–750 нм (Q-полоса).

Присутствующие абсорбционные максимумы в области 405 и 660 нм подтверждают включение фотосенсибилизатора порфиринового ряда Хлорина е6 в состав PEI/e6/DTPA/FA/Eu. В ультрафиолетовом спектре в области 256, 283 и 365 нм обнаруживаются также полосы поглощения фолиевой кислоты, введенной в структуру для избирательного нацеливания на опухоль [2]. На основании данных атомно-силовой микроскопии и энергодисперсионного спектра лиофилизованного конъюгата определена аморфная структура вещества, имеющего в составе заданные в процессе синтеза элементы, а именно углерод, азот, кислород и европий. Положение функциональных групп подтверждено инфракрасной (ИК) спектроскопией. В ИК-спектрах в области колебаний с участием COOH групп у DTPA и фолиевой кислоты обнаруживаются полосы поглощения с максимумами 1692, 1637, 1604 и 1731, 1689, 1631 cm^{-1} соответственно.

* Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям, договор № 17713ГУ/2022.

© О. В. Шевченко, Н. Г. Плехова, М. А. Медков, 2023



Изменение интенсивности флуоресценции раствора 15 мкг/мл PEI/e6/DTPA/FA/Eu и свободного 15 мкг/мл Хлорина е6 в присутствии 4 мкг/мл флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетата при облучении красным светом лазера $\lambda = 645$ нм

На основании модельного эксперимента в рамках настоящего исследования подобраны оптимальные условия воздействия источником красного света. Показано, что при 20 мин воздействия полупроводникового лазера с $\lambda = 645$ нм осуществляется эффективное возрастание интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора с минимизацией эффекта его фотовыгорания. На клетках асцитной аденокарциномы Эрлиха определена фототоксичность фотосенсибилизаторов методом проточной цитометрии: через 4 сут после контакта с молекулярным конъюгатом в концентрации 12,5 мкг/мл количество нежизнеспособных клеток составило $81,5 \pm 4,1$ %, в то время как для неконъюгированной формы Хлорина е6 — $47,74 \pm 2,4$ %. Полученные данные свидетельствуют о перспективе дальнейшего исследования нового молекулярного конъюгата в качестве потенциального фотодинамического агента.

Литература

1. Li X., Lee S., Yoon J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy // *Chemical Society Reviews*. 2018. Vol. 47, № 4. P. 1174–1188.
2. Olmo F., Rodriguez A., Colina A., Heras A. UV/Vis absorption spectroelectrochemistry of folic acid // *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2022. Vol. 26, № 1. P. 29–37.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-150

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО БИОСИМИЛЯРА ПЕРТУЗУМАБА,
СИНТЕЗИРУЕМОГО В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ
В ВИДЕ ПРОЦЕССИРУЕМОГО ПОЛИПРОТЕИНА***

**EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE PRODUCTION OF PLANT BIOSIMILAR
PERTUZUMAB SYNTHESIZED IN A PLANT CELL IN THE FORM OF A PROCESSED POLYPROTEIN**

Е. В. Шешукова¹, Д. В. Поздышев², И. И. Круглов², Т. В. Комарова^{1,2}

¹Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E. V. Sheshukova¹, D. V. Pozdishev², I. I. Kruglov², T. V. Komarova^{1,2}

¹Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow

²Lomonosov Moscow State University, Moscow

✉ sheshukova@vigg.ru

Аннотация

В настоящей работе была усовершенствована система для продукции в растении *Nicotiana benthamiana* антитела, по аминокислотной последовательности соответствующего пертузумабу. Данный подход основан на синтезе полипротеина, включающего в себя легкую и тяжелую цепи антитела, соединенные между собой линкером, выщепляемым протеазами растительной клетки.

Abstract

The following work has improved the system for the production of an antibody in the plant *Nicotiana benthamiana* that, according to its amino acid sequence, is similar to pertuzumab. This approach is based on the synthesis of a polyprotein which includes light and heavy chains of antibodies interconnected by a linker which is recognized and digested by plant cell proteases.

Использование растений в качестве платформы для продукции рекомбинантных белков представляет собой перспективное направление. Продемонстрирована возможность применения этого подхода для получения различных рекомбинантных белков, например коллагена, человеческого соматотропина, гемагглютинаина, поверхностного антигена вируса гепатита В, антираковых антител и многих других [1]. В большинстве случаев для наработки рекомбинантных белков в листьях используют растения австралийского табака, *Nicotiana benthamiana*. А наиболее привлекательным объектом для продукции в растении являются иммуноглобулины класса G, так как выход таких антител, как правило, достаточно высокий благодаря их эффективному накоплению в клетках и относительно простой и специфичной процедуре очистки с помощью аффинной хроматографии. Для получения полноразмерного антитела используют как систему временной (транзиентной) экспрессии, так и стабильно трансформированные растения.

Однако трансгенные растения подразумевают более существенные затраты времени, кроме того, их получение представляется гораздо более трудоемким по сравнению с использованием подхода транзиентной экспрессии. Таким образом, для продукции антител наибольшую популярность получил метод временной трансформации, при котором в клетки растений с помощью агробактерии одновременно доставляют генноинженерные конструкции, одна из которых кодирует легкую цепь (ЛЦ) антитела, а другая — тяжелую (ТЦ). Ранее мы продемонстрировали [2] применение этого подхода для накопления в растении антитела, идентичного по аминокислотной последовательности трастузумабу и пертузумабу — терапевтическим антителам, используемым в терапии Her2-позитивного рака молочной железы. Несмотря на высокую эффективность продукции антител в растении, остается проблема корректной сборки антител, для которой необходимо эквимолярное соотношение ТЦ и ЛЦ.

В настоящей работе перед нами стояла цель усовершенствовать систему продукции антитела, аналогичного пертузумабу, в растении. Для этого были поставлены следующие задачи: 1) получить генноинженерные конструкции, кодирующие полипротеин, содержащий ЛЦ и ТЦ, по аминокислотному составу соответствующие пертузумабу, и процессируемый в растительной клетке; 2) оценить корректность процессинга и подтвердить про-

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-3828.2022.1.4.

© Е. В. Шешукова, Д. В. Поздышев, И. И. Круглов, Т. В. Комарова, 2023

дукцию полноразмерного антитела; 3) проверить способность полученного антитела связываться с FcγRIII рецептором и узнавать антиген Her2 на поверхности клеток.

В качестве участка, узнаваемого и выщепляемого эндогенными протеазами растительной клетки, была выбрана последовательность КР6pp препротоксина патогена кукурузы *Ustilago maydis*, узнаваемая фурин-подобными протеазами растений [3, 4]. Этот линкер длиной 33 аминокислотных остатка соединял ЛЦ и ТЦ пертузумаба в полипротеине, кодируемом созданной генноинженерной конструкцией для транзientной экспрессии в растении. Нами показано, что данный полипротеин успешно процессируется в клетке, что позволяет выделять полноразмерные антитела с помощью аффинной хроматографии на сефарозе с белком А. Методом проточной цитофлуориметрии было показано, что полученные антитела способны эффективно связываться с FcγRIII рецептором, экспонированным на поверхности клеток линии CHO-K1.Cl6, что необходимо для запуска антиген-зависимой клеточной цитотоксичности. Также была подтверждена способность этих антител узнавать антиген HER2/neu на поверхности клеток линии BT-474.

Разработанная система продукции в растениях *N. benthamiana* рекомбинантного антитела, идентичного по аминокислотной последовательности пертузумабу, в виде полипротеина, процессируемого эндогенной протеазой растений, может быть использована для продукции антител в растительной клетке.

Литература

1. Shanmugaraj B., Bulaon C.J. I., Phoelcharoen W. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production // *Plants*. 2020. Vol. 9 (7). P. 842.
2. Komarova T.V., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N. et al. Trastuzumab and Pertuzumab Plant Biosimilars: Modification of Asn297-Linked Glycan of the MAbs Produced in a Plant with Fucosyltransferase and Xylosyltransferase Gene Knockouts // *Biochemistry*. 2017. Vol. 82 (4). P. 510–520.
3. Jiang L., Rogers J.C. Functional Analysis of a Golgi-Localized Kex2p-like Protease in Tobacco Suspension Culture Cells // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. 1999. Vol. 18 (1). P. 23–32.
4. Kinal H., Park C.M., Berry J.O., Koltin Y., Bruenn J.A. Processing and Secretion of a Virally Encoded Antifungal Toxin in Transgenic Tobacco Plants: Evidence for a Kex2p Pathway in Plants // *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7 (6). P. 677–688.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-151

ПОДБОР УСЛОВИЙ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ АЛЮМИНИЕВОГО БИОЧИПА *

SELECTION OF CONDITIONS FOR COVALENT IMMOBILIZATION OF FLUORESCENTLY LABELED OLIGONUCLEOTIDES ON THE SURFACE OF AN ALUMINUM BIOCHIP

И. Ю. Шишкин, С. А. Лапа, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

I. Yu. Shishkin, S.A. Lapa, A.V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ shishkin.iv2017@yandex.ru

Аннотация

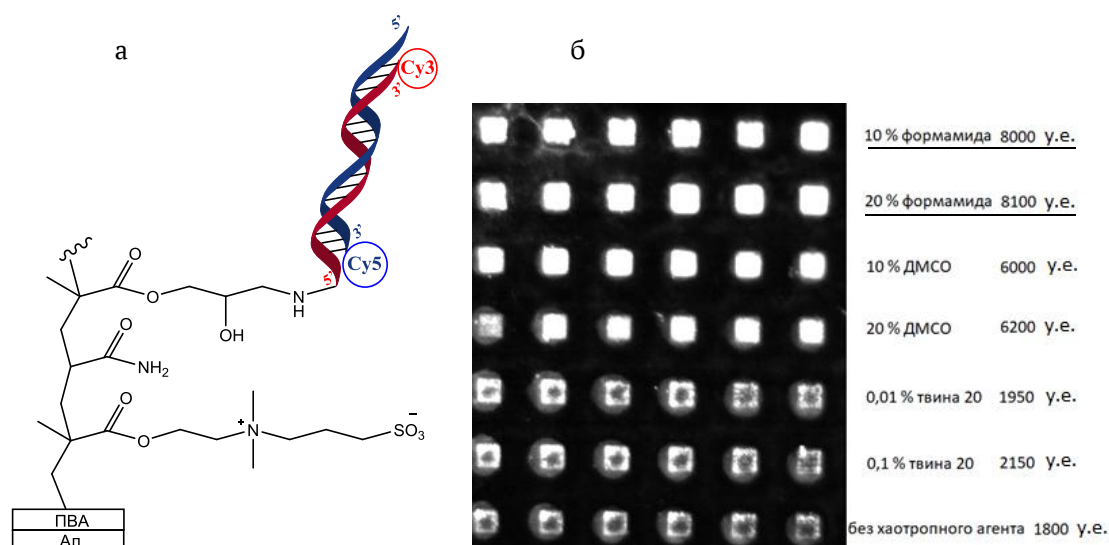
Получены «полимерные щетки» с функциональными эпоксидными группами на алюминиевой подложке биочипа методом УФ-инициируемой радикальной полимеризации. На эпоксидных группах биочипа проведен подбор условий иммобилизации флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов с различными хаотропными агентами.

Abstract

“Polymer brushes” with functional epoxy groups on an aluminum substrate of a biochip were obtained by UV-initiated radical polymerization. The conditions of immobilization of fluorescently labeled oligonucleotide probes with various chaotropic agents were selected on the epoxy groups of the biochip.

Проведение ПЦР на чипе требует наличия подложки из теплопроводного материала, например металла. Из множества различных металлов выбран алюминий, однако из-за сорбции компонентов ПЦР и ингибирования ДНК-полимеразы требуется проведение его модификации. На эффективность проведения ПЦР на чипе также влияет плотность иммобилизованных праймеров на его поверхности.

Нами проведено ковалентное связывание поверхности алюминия с фотоактивным полимером — поливинилацетатом (ПВА), который биосовместим с компонентами ПЦР. Обработанную щелочным раствором ПАВ с рН 11 поверхность алюминия покрывали при центрифугировании раствором ПВА в метилэтилкетоне с добавлением бензофенона в качестве фотоинициатора, затем помещали в УФ-полимеризатор. ПВА в присутствии фо-



Схематичное изображение алюминиевого биочипа (а), изображение чипа, полученное на флуоресцентном микроскопе, и значения сигналов в условных единицах (у. е.) при выдержке 100 мс (б)

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-14-00287-П.

© И. Ю. Шишкин, С. А. Лапа, А. В. Чудинов, 2023

тоинициатора и при УФ-облучении подвергается реакции кросс-сшивания. В результате получали химически инертную к компонентам ПЦР подложку из алюминия, покрытую слоем ПВА (Ал-ПВА).

Для иммобилизации олигонуклеотидных зондов использовали метод УФ-инициируемой радикальной полимеризации от поверхности с целью получения «полимерных щеток» со встроенными мономерами, имеющими функциональные эпоксидные группы для связывания с ДНК-зондами (см. рисунок, а). Для этого добавляли раствор, содержащий мономеры глицидилметакрилата, акриламида, гидрохлорида [2-(метакрилокси)этил]диметил-(3-сульфопропил)аммония в деионизированной воде и метаноле (1 : 1) и через фотомаску облучали УФ-лампой. Модифицированные олигонуклеотидные зонды содержат С6-аминолинкер на 5'-конце и флуоресцентную метку Су3 на 3'-конце. Раствор для иммобилизации ДНК-зондов также содержал различные хаотропные агенты для разрушения межмолекулярных водородных связей и глицерин для предотвращения растекаемости по поверхности между ячейками. Подбор хаотропного реагента и его концентрации проводился экспериментально. Регистрацию сигналов по иммобилизованным на эпоксидные группы ДНК-зондам проводили методом цифровой флуоресцентной микроскопии на канале длины волны Су3. Выявлено и наглядно продемонстрировано, что наиболее оптимальным для иммобилизации является содержание 10 или 20 % формамида в растворе 0,1 М NaHCO₃ (при постоянном процентном содержании глицерина 5 %) (см. рисунок, б). Доступность ДНК-зондов проверяли гибридизационным анализом с их мишенью, имеющей флуоресцентную метку Су5 на 3'-конце.

Таким образом, представленный экспериментальный подбор условий для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов на алюминиевую подложку представляет интерес в развитии технологии проведения твердофазной ПЦР на чипе в закрытой системе.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-152

МЕТОДЫ АКТИВАЦИИ «ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ» ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ МЕТАКРИЛАТА В ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ БИОЧИПОВ***METHODS OF ACTIVATION OF POLYETHYLENE GLYCOL METHACRYLATE "BRUSH POLYMERS" IN PROTEIN BIOCHIP TECHNOLOGY**

Г. Ф. Штылев, А. И. Левашова, В. И. Бутвиловская, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

G. F. Shtylev, A. I. Levashova, V. I. Butvilovskaya, A. V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ gosha100799@mail.ru

Аннотация

Изучены способы активации «полимерных щеток» из полиэтиленгликоль метакрилата, прикрепленных к поверхности модифицированного полибутилентерефталата. Выполнена иммобилизация белка, маркированного флуоресцентным красителем Cy3, для проверки активирующего агента на реальной модели для использования чипа в иммунохимическом анализе антител.

Abstract

Methods of activation of polymer brushes from polyethylene glycol methacrylate attached to the surface of modified polybutylene terephthalate were studied. Immobilization of protein labeled with fluorescent dye Cy3 was performed to test the activating agent on a real model for use of the chip in immunochemical antibody analysis.

Биочипы являются перспективной аналитической платформой, поскольку они обладают высокой чувствительностью за счет улучшенного соотношения сигнала к фону и высокой скоростью реакции из-за более коротких диффузионных расстояний. Кроме того, за счет иммобилизации различных наборов зондов можно осуществлять параллельный анализ разнообразных мишеней. Гидрогелевые ячейки, составленные из «щеточных полимеров», обладают трехмерной структурой, что обеспечивает большую емкость иммобилизации зондов и более высокую кинетику связывания с ответными мишенями. «Щетки» из полиэтиленгликоль метакрилата позволяют уменьшить неспецифическую сорбцию мишеней и увеличить специфичность анализа. Подбор оптимальных условий активации гидроксильных групп позволит улучшить чувствительность анализа.

Подложку из полибутилентерефталата (ПБТ) обработали фотоактивным полимером, содержащим поливинилацетат и бензофенон, с помощью метода центрифугирования. На поверхность обработанной подложки нанесли водный раствор полиэтиленгликоль метакрилата и облучали в полимеризационном шкафу с ультрафиолетовым облучением ($\lambda = 254$ нм) через специальную кварцевую маску с ячейками. Под действием УФ помимо прививки «щеточных полимеров» на поверхность чипа происходят реакции радикального присоединения ПБТ и фотоактивного полимера, а также реакция кросс-сшивания поливинилацетата. В ходе полимеризации образуется массив гидрофильных ячеек, состоящих из «щеточных полимеров» полиэтиленгликоль метакрилата. Активацию гидроксильных групп проводили несколькими способами (рис. 1).

Иммобилизацию красителя на поверхность биочипа подтверждали методом флуоресцентной микроскопии (см. таблицу). Использование DSC в качестве активирующего реагента показало наилучшую эффективность для «полимерных щеток» с гидроксильными группами.

Оценка эффективности активации гидроксильных групп при помощи иммобилизации флуоресцентного красителя Cy5

	Активаторы –ОН группы		Модификация –ОН группы в –COOH группу
	DSC	CDI	SA + DMAP + EDC
$I_{\text{сигнала}}$	18000	4000	3000
$I_{\text{фона}}$	50	30	60
$I_{\text{сигнала}}/I_{\text{фона}}$	360	133	50

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-14-00287-П.

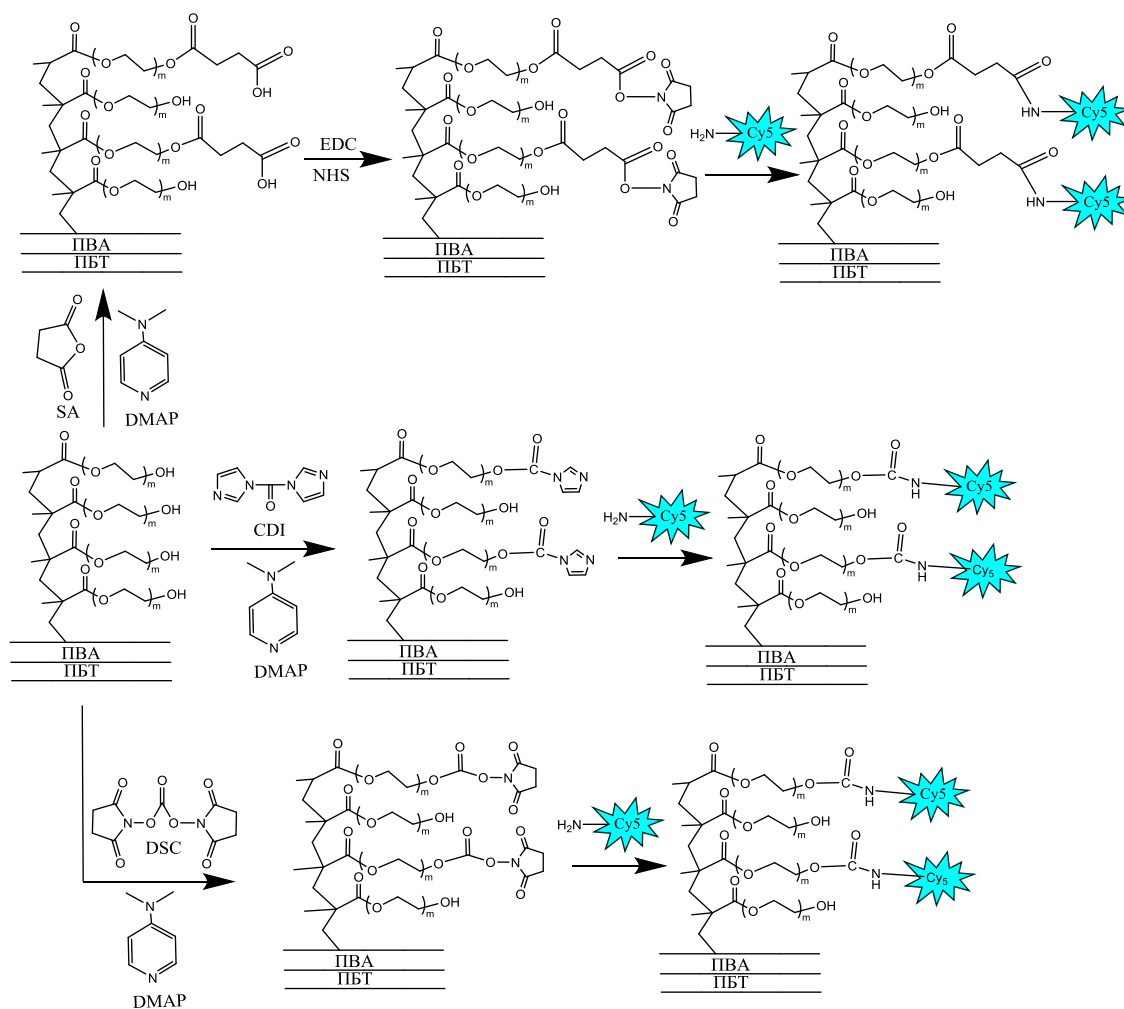


Рис. 1. Методы активации гидроксильных групп

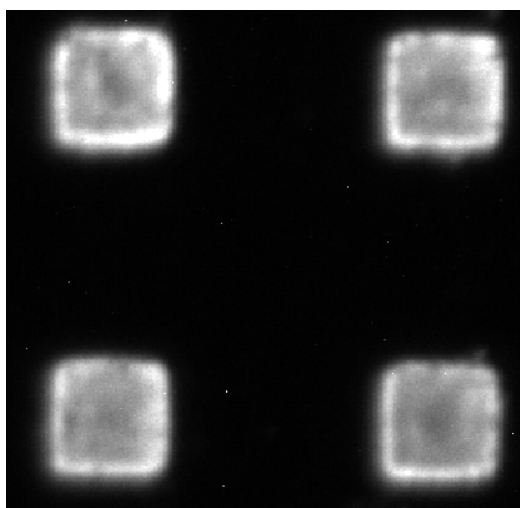


Рис. 2. Флуоресцентная картина биочипа при иммобилизации стрептавидина на канале Cy3

Для анализа белков при использовании «щеточного биочипа» на активированную поверхность иммобилизовали стрептавидин, маркированный флуоресцентным красителем Cy3 (рис. 2). Соотношение сигнал/фон на канале Cy3 составило 60. Функциональность иммобилизованных молекул подтверждали иммунохимическим анализом с биотинилированными античеловеческими антителами козы, маркированными флуоресцентным красителем Cy5. Соотношение сигнал/фон на канале Cy5 составило 40.

Таким образом, активация «полимерных щеток» с гидроксильными группами при помощи *N,N*-дисукцинимидилкарбоната (DSC) является перспективным способом иммобилизации белков на поверхность биочипа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-153

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ
С ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ*****ANTIOXIDANT AND ANTIPLATELET PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH LIPOIC ACID**

В. А. Щелконогов¹⁻³, А. М. Иншакова¹, Е. С. Дарнотук¹, А. В. Шипелова¹, Н. С. Шастина¹,
О. А. Баранова^{2,3}, А. В. Чеканов^{2,3}, К. Д. Казаринов³, Э. Ю. Соловьева², А. И. Федин²

¹*МИРЭА — Российский технологический университет, Москва*

²*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*

³*Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Фрязино*

V. A. Shchelkonogov¹⁻³, A. M. Inshakova¹, E. S. Darnotuk¹, A. V. Shipelova¹, N. S. Shastina¹,
O. A. Baranova^{2,3}, A. V. Chekanov^{2,3}, K. D. Kazarinov³, E. Yu. Soloveva², A. I. Fedin²

¹*MIREA — Russian Technological University, Moscow*

²*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

³*Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics RAS, Fryazino*

✉ vasilii9999@yandex.ru

Аннотация

Были получены наночастицы (НЧ) с липоевой кислотой (ЛК), с размером частиц от 25 до 350 нм, характеризующиеся ее медленным высвобождением из нанодисперсий (НД) и высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. В наноэмульсиях (НЭ) удалось солюбилизовать ЛК в 1,5 раза в сравнении с липосомами (Лс). Показано, что НЧ с ЛК обладают выраженными антиоксидантными и антиагрегационными свойствами.

Abstract

Nanoparticles (NPs) with lipoic acid (LA) with a particle size 25–350 nm were obtained, characterized by its slow release from nanodispersions and high stability during long-term storage at room temperature. In nanoemulsions, it was possible to solubilize LA by 1.5 times than in liposomes. It was shown that NPs with LA have pronounced antioxidant and antiplatelet properties.

Цереброваскулярные заболевания являются наиболее распространенными формами патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов. К основным патогенетическим механизмам развития инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза 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, быстро связывается с белками, биодegradирует, что приводит к уменьшению терапевтического действия.

Цели работы — получение наночастиц с ЛК для ее солюбилизации в водных растворах, пролонгированного высвобождения, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

Вначале получали наночастицы с ЛК (липосомы и наноэмульсии). Лс ФХ ЛК получали пассивной загрузкой, диспергируя липидную пленку фосфатным буферным раствором (ФБР, pH 7,4) с последующей экструзией. 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 были получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК и НЭ с ЛК на основе ФХ, олигоглицерина (ОГ) и плуроника Ф68, в ФБР (pH 7,4; 0,15 мМ) с размером частиц от 25 до 310 нм. НЧ с ЛК на основе Ф68 и ОГ были гетерогенными и состояли из двух фракций НЧ: 20–70 нм (25 ± 5 %) и 110–310 нм (75 ± 5 %). Было показано, что НЧ с ЛК были стабильными при длительном хранении (> 2 лет) при комнатной температуре и при +4 °С. Наноконструкции были электронейтральными.

При сравнении характеристик полученных наноконструкций с ЛК было показано, что в НЭ удалось солюбилизовать ЛК в 1,5 раза, используя максимальную концентрацию ЛК 8 мг/мл, в то время как для получения

* Исследования выполнены в рамках государственных заданий № 122051600109-5 (РНИМУ им. Н. И. Пирогова) и № 122041900109-3 (ИРЭ РАН), а также при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «Базис» (грант № 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, 2023

липосом с ЛК использовали концентрации 1 и 5 мг/мл. При дальнейшем повышении количества ЛК в липосомах образовывались нестабильные дисперсии.

Методом крио-ПЭМ было обнаружено, что Лс ФХ представляют с собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул сферической формы частиц, а НЭ представляют систему, состоящую из однослойных и мультислойных наноструктур разного размера.

Далее изучали кинетику высвобождения ЛК из наночастиц. Было показано, что из липосом за 24 ч высвободилось 45 ± 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 нанодисперсий с ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) в плазме крови, выделенной из крови здоровых доноров. Агрегацию Тц индуцировали арахидоновой кислотой (АК), поскольку в результате ее действия образуются различные метаболиты, в том числе продукты ПОЛ. Было показано, что Лс ЛК (1–2 мМ) снижают степень и скорость агрегации тромбоцитов на 30–45 % относительно контроля. Все типы НЭ ЛК (1–4 мМ) эффективнее на 45–85% уменьшают агрегацию Тц, обусловленную АК. Водорастворимые формы и НЧ без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. По-видимому, нанодисперсии с ЛК способны 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 тиобарбитурат-активных продуктов (ТБК-АП) в образцах обогащенной Тц плазмы инкубированных с АК. Добавление 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 НЧ с ЛК можно считать ингибирование ею процесса иницирования продуктов перекисидации липидов и АФК с помощью АК.

Таким образом, наночастицы с ЛК являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vivo*.

Литература

1. Shchelkonogov V. A., Inshakova A. M. et. al. Nanoparticles of lipoic acid esters: preparation and antioxidant effect // *Mend. Commun.* 2021. Vol. 31. P. 507508.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-154

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ *IN VITRO* ТРАНСКРИПЦИИ мРНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ Т7 РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ПОЛИАДЕНИЛАТ-ПОЛИМЕРАЗЫ**OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR *IN VITRO* TRANSCRIPTION OF MRNA CATALYSED BY RECOMBINANT T7 RNA POLYMERASE AND POLY(A)-POLYMERASE**А. В. Юрченко^{1,2}, Е. Л. Циммерман^{1,2}, О. А. Добровольская², В. В. Высочинская^{1,2}, Е. А. Елпаева²¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого²Научно-исследовательский институт гриппа им. А. А. Смородинцева, Санкт-ПетербургA. V. Yurchenko^{1,2}, E. L. Zimmerman^{1,2}, O. A. Dobrovolskaya², V. V. Vysochinskaya^{1,2}, E. A. Elpaeva²¹Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University²Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

✉ sanyurch@gmail.com

Аннотация

Реакция *in vitro* транскрипции (IVT) является важным этапом в получении синтетических мРНК. Оптимизация условий реакции IVT и использование собственных реагентов приведут к минимизации времени реакции и затрат при максимальном выходе продукта. Мы синтезировали мРНК с помощью оригинальных ферментов T7-Pol и PAP, провели анализ трансляции, трансфекции и интенсивности флуоресценции полученных образцов в сравнении с контрольной коммерческой мРНК.

Abstract

The *in vitro* transcription reaction (IVT) is an important step in the production of synthetic mRNAs. Optimizing the reaction conditions of the IVT and using its own reactants will minimize the reaction time and costs at maximum yield. We synthesized mRNAs using original T7-Pol and PAP enzymes, performed translation, transfection, and fluorescence intensity analyses of the obtained samples versus control commercial mRNAs.

Целью данной работы было оптимизировать условия IVT для эффективного синтеза функциональной мРНК, кодирующей последовательность зеленого флуоресцентного белка (eGFP), с использованием оригинальных рекомбинантных ферментов.

Рекомбинантные белки, T7 РНК-полимеразу (T7-Pol) и полиаденилат-полимеразу (PAP), получали в системе экспрессии *E. coli*. Для этого были получены штаммы-продуценты рекомбинантных белков на основе клеток *E. coli* штамма BL21-DE3 с использованием ранее сконструированных плазмид рQE-80L-Kan_T7WT и рET302/NTHis_PAP, содержащих гены рекомбинантных белков T7-Pol и PAP. Для экспрессии ферментов в полученных штаммах-продуцентах были подобраны оптимальные условия индукции методом Штудера. Очистка белков была проведена методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозой.

В качестве матрицы для IVT была сконструирована плазида рJET1.2-eGFP и линейаризована по сайту рестрикции HindIII, в итоге ожидаемая длина синтетической мРНК составила 1000 нуклеотидов.

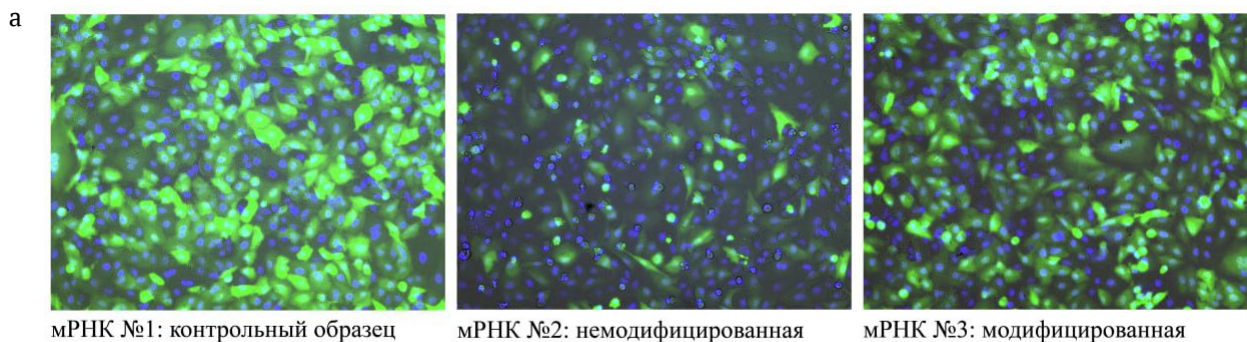
Для повышения эффективности транскрипции и кэпирования мРНК было подобрано оптимальное соотношение концентрации 5'-кэп-аналога (m7GmAmG, Биолабмикс©) к GTP (2 : 1, 3 : 1, 4 : 1) и подобрано количество Mg²⁺ в реакции IVT для большей активации мРНК-полимеразы T7. Проверка успешности проведения реакций была осуществлена методом электрофоретического разделения, по результатам которого оптимальным соотношением концентрации аналога кэпа m7GmAmG к GTP было выбрано 3 : 1, оптимальная концентрация ионов кофактора на реакцию — 8 мМ. Продуктом оптимизированной реакции был образец мРНК № 2. Для контроля была синтезирована модифицированная мРНК (№ 1, коммерческим набором Jena Bioscience©).

Модифицированную мРНК (№ 3) получали в реакции IVT посредством замены УТР и СТР на их измененные аналоги (Ψ-УТР) и (5-Ме-СТР).

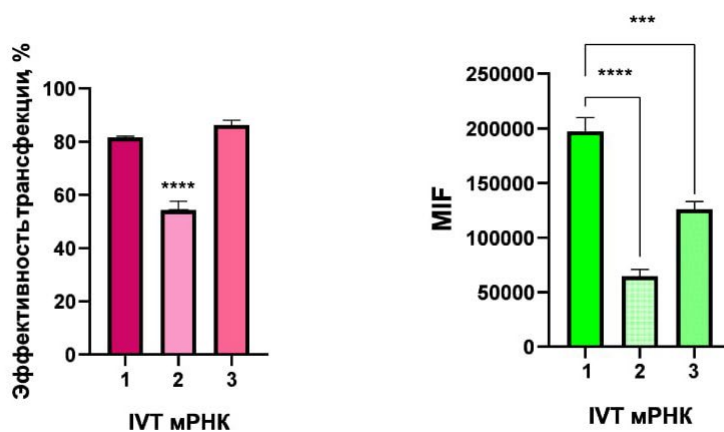
Оценка эффективности трансфекции полученной мРНК и экспрессии белка eGFP проводилась в клетках A549. Пробы мРНК № 1 (контрольная), 2 и 3 в количестве 100 нг упаковывали в липидные наночастицы с помощью набора Lipofectamine MessengerMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA).

Изображения экспрессированных белков eGFP получены с использованием флуоресцентной микроскопии (см. рисунок, а). Эффективность трансфекции определяли количественно с помощью проточной цитометрии

с использованием CytoFLEX (Beckman Coulter, США) на основе двух параметров: процента трансфекции (%) и средней интенсивности флуоресценции (MFI). Результаты статистической обработки данных по среднему значению переменных представлены на рисунке (см. рисунок, б).



б



а — изображения культуры клеток A549 с экспрессированным белком eGFP, полученные с использованием флуоресцентной микроскопии. мРНК № 1 — контрольный образец с модифицированными нуклеотидами; мРНК № 2 — образец, синтезированный с использованием рекомбинантных ферментов и немодифицированных нуклеозидов; мРНК № 3 — образец, синтезированный с использованием рекомбинантных ферментов и модифицированных нуклеозидов; б — сравнительные графики по эффективности трансфекции (розовый цвет) для образцов мРНК № 1, № 2, № 3 и по среднему уровню флуоресценции FITC (зеленый цвет) для образцов мРНК № 1, № 2, № 3

В результате исследования была разработана система для получения кэпированной синтетической мРНК с использованием полученных рекомбинантных белков Т7 РНК-полимеразы и полиаденилат-полимеразы.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-155

**ПОДХОД НА ОСНОВЕ DOE ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ПОДБОРА
СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ДОБАВОК БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ**

**DOE-BASED APPROACH TO ACCELERATE THE SELECTION
OF STABILIZING ADDITIVES FOR PROTEIN SOLUTIONS**

А. С. Яровиков, С. А. Ищук, В. И. Шмурак

*R&D центр компании «Герофарм»,
Санкт-Петербург*

A. S. Iarovikov, S. A. Ishchuk, V. I. Shmurak

*Geropharm R&D Center,
Saint Petersburg*

✉ aleksandr.iarovikov@geropharm.com

Аннотация

В работе описан подход, основанный на DOE, который позволяет значительно ускорить подбор добавок и их оптимальных концентраций для стабилизации белковых молекул в растворе. Откликом для модели является температура плавления, которую измеряли методом DSF. По результатам проведенных экспериментов удалось подобрать состав, обеспечивающий повышение температуры плавления fc-fusion белка на 5 °С.

Abstract

The paper describes an approach based on DOE, which makes it possible to speed up the process of selecting additives and their optimal concentrations for the stabilization of protein molecules in solution. The response for the model was the melting temperature, which measured by DSF method. According to the results of the experiments, it was possible to choose a composition that provides an increase in the melting temperature of the fc-fusion protein by 5 °C.

Биотехнологические препараты на основе рекомбинантных белков становятся все более распространенными в современной медицине, однако производство и применение рекомбинантных белков сопряжено с некоторыми трудностями. Одним из явных рисков является склонность белковых молекул к агрегации, что может привести к снижению качества препарата. Поэтому поддержание молекулы в активном и стабильном состоянии на протяжении всего процесса выделения и очистки, а также при дальнейшем хранении является очень важной задачей, не имеющей на данный момент тривиальных решений. Такие сложности во многом сопряжены с тем, что отсутствуют быстрые и эффективные методы прогнозирования и оценки стабильности белковой молекулы. Однако в качестве косвенного маркера стабильности белковой молекулы в растворе может служить температура «плавления» [1]. Данная характеристика показывает, при какой температуре происходит термическая денатурация белка, и может быть смоделирована изменением состава раствора, в котором находится белок.

В данной работе описаны эксперименты по подбору состава итоговой формуляции для белковой молекулы с применением статистического подхода DOE (design of experiment). В качестве отклика для модели была использована температура «плавления» белка, которую измеряли методом DSF (differential scanning fluorimetry) с использованием красителя SYPRO orange и прибора PCR CFX96 Real-time Touch. Объектом исследования являлся fc-fusion белок с молекулярной массой 64 кДа.

В результате анализа литературы были выявлены основные компоненты, применяемые при формуляции fc-fusion белков и МАВ, которые были объединены в группы по типу оказываемого эффекта: буферные соли, аминокислоты, ПАВ и осмолиты. После этого с применением программного обеспечения MODDE 12.1 был составлен D-оптимальный план прескрининга параметров, включающий 30 экспериментов. На основании полученных результатов были выявлены некоторые ограничения метода, а также фавориты в каждой из групп факторов. В качестве следующего этапа было необходимо установить оптимальные концентрации для каждого из выбранных компонентов. Для этого был составлен D-оптимальный план оптимизации параметров, включающий 29 экспериментов. На основании полученных результатов был спрогнозирован оптимальный состав, обеспечивающий наибольшую температуру «плавления». Данный состав был проверен экспериментально, и полученные результа-

ты сходились с предсказанным значением. По результатам проведенных экспериментов удалось поднять температуру плавления белка с 60 до 65 °С. Для подтверждения эффективности проведенных работ белок был заложен на исследования стабильности в подобранном составе.

Литература

1. Boivin S., Kozak S., Meijers R. Optimization of protein purification and characterization using ThermoFluor screens. *Protein Expr Purif.* 2013. Vol. 91 (2). P. 192–206. DOI: 10.1016/j.pep.2013.08.002.

РАЗДЕЛ III

БИОФИЗИКА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-156

INTERACTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN WITH DIVALENT METAL IONS

E. V. Fedotova, S. V. Paston, A. D. Goroh

Saint Petersburg State University

✉ st077318@student.spbu.ru

Abstract

In this work, the structure of human serum albumin in aqueous solution was studied upon interaction with Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} ions. The transition metal ions provoke an increase in the content of β -layers and a decrease in the quantity of α -helices in the protein structure. In the presence of Cu^{2+} , aggregation and a change in the sign of the surface charge of protein particles are observed.

Nowadays, the problem of prevention and treatment of neurodegenerative diseases caused by conformational changes in the structure of globular proteins leading to the formation of amyloid fibrils becomes very relevant. There is evidence that globular proteins have a high affinity for metal ions. As a result of their binding, the formation of intermolecular β -layers is possible, which provokes the development of amyloidosis [1]. In this work, the interaction of a model globular protein human serum albumin (HSA) with various divalent metal ions in solution and the conformational changes of the protein caused by this interaction were investigated.

In this work, the method of FTIR spectroscopy on the ATR crystal with deconvolution of the Amide I band was used to study the secondary structure of the protein [2]. The tertiary structure of HSA was studied by detection of absorption and intrinsic fluorescence spectra of the protein [3]. The zeta potential method was used to characterize the surface charge of protein particles. In this study, we investigated the HSA in the solution of metal ions Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} when the concentration of metal ions was varied in the range of $[Co^{2+}]:[HSA]$ from 0 to 100, $[Mg^{2+}]:[HSA]$ from 0 to 10000, $[Mn^{2+}]:[HSA]$ from 0 to 50, $[Cu^{2+}]:[HSA]$ from 0 to 50.

The absorption and fluorescence spectra of aromatic amino acids of the protein measured in solutions containing Co^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+} ions did not undergo significant changes, indicating that there were no disturbances in the tertiary structure of the protein and no signs of aggregation. The presence of copper ions in the albumin solution, on the contrary, strongly affects the absorption and fluorescence spectra. Already at the ratio $[Cu^{2+}]:[HSA] = 1:1$, a partially reversible aggregation of the protein in solution is observed. This leads to a noticeable increase in the optical density D far from the absorption band of the protein. At the same ratio, a drastic increase in D in the absorption band of the protein and a drop in fluorescence intensity I_{fl} is observed. At $[Cu^{2+}]:[HSA] > 1$, a slight drop in D and an increase in I_{fl} are observed. These changes indicate a strong cooperative binding of HSA with copper.

The investigation of the secondary structure of HSA by FTIR spectroscopy has shown that the increase in the content of metal ions in solutions of HSA with Co^{2+} and Mn^{2+} tends to increase the number of β -layers and decrease the number of α -helices in the protein structure. Magnesium ions have no noticeable effect on the secondary structure of HSA. In the presence of copper ions at the ratio $[HSA]:[Cu^{2+}] > 1$, there is a strong disruption of the secondary structure of the protein: the content of α -helices decreases and the content of β -sheets increases both in solution and in the aggregated fraction.

The protein binding with cations is clearly manifested by the zeta potential values of HSA particles: the negative zeta potential of the protein decreases modulo in the presence of divalent cations. The charge of albumin increases, approaching zero, at the concentration ratio $[Mg^{2+}]:[HSA] = 1000$ or $[Co^{2+}]:[HSA] = 100$. The interaction of HSA with Cu^{2+} leads to a change in the sign of the protein charge. The zeta potential reaches zero at a ratio of 1:1. The recharging of albumin molecules indicates the formation of a strong complex with copper cations.

It can be concluded that the interaction of HSA with Mg^{2+} ions occurs under the action of electrostatic forces and reaches saturation at the ratio $[Mg^{2+}]:[HSA] = 1000$, while the protein structure is not disturbed. The interaction

of HSA with manganese and cobalt ions does not cause disturbance of the tertiary structure of the protein, however, these cations are able to form coordination bonds and, probably, to provoke the formation of β -layers. Copper ions show high affinity for HSA, causing aggregation of the protein, but a part of albumin molecules remains in solution. Disturbances in the secondary structure of HSA, both aggregated and in solution, are fixed at $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{HSA}] = 2:1$. Thus, copper ions form a strong coordination bond with serum albumin.

Part of the research was performed at the Research park of Saint Petersburg State University "Center for Optical and Laser Research".

References

1. Jakob-Roetne R., Jacobsen H. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches // *Angewandte Chemie International Edition*. 2009. Vol. 48. P. 3030–3059.
2. Kong J., Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2007. Vol. 39. P. 549–559.
3. Cantor C. R., Schimmel P. R. *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1980.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-157

NEW COLLOIDAL SYSTEMS BASED ON BIOMIMETIC POLYCOMPLEXES*

I. V. Grigoryan^{1,2}, V. V. Spiridonov², A. M. Adelyanov², Y. A. Koksharov^{1,2},
K. V. Potapenkov², I. V. Taranov¹, G. B. Khomutov^{1,2}, A. A. Yaroslavov²

¹*Institute of Radio-engineering and Electronics RAS, Moscow*

²*Lomonosov Moscow State University*

✉ grigorian.iv19@physics.msu.ru

Abstract

In the article, new colloidal systems are obtained and studied, which have prospects for use as carriers of medicinal compounds. The colloidal systems under consideration are polymer complexes based on polyacrylic acid of various molecular weights and biogenic polyamine with magnetic iron oxide nanoparticles. The magnetic properties of polycomplexes with included magnetic iron oxide nanoparticles have been studied.

Currently, one of the most urgent interdisciplinary problems at the intersection of biophysics, chemistry and medicine is the creation of new effective drug therapy systems based on the selective and targeted delivery of drugs directly to the areas of the body that are the targets of therapeutic action. The solution to this problem is associated with the development of biocompatible colloidal drug encapsulation agents that can provide controlled targeted delivery and release of drugs to target areas of the body. At the same time, the control of the localization of colloidal carriers and drugs in biological liquid media of the body can be provided by chemical, biochemical and physical (in particular, magnetic) influences.

This paper describes new colloidal magnetic polymer systems based on biocompatible polymers modified with the biogenic polyamine spermine, which can be used for drug encapsulation and delivery. The main characteristics of the polycomplexes were determined, and their images were obtained by atomic force microscopy.

Also, in the course of the work, the possibility of including medicinal compounds in polycomplexes was demonstrated using the example of an antitumor drug — doxorubicin. The polycomplexes were functionalized with magnetic iron oxide nanoparticles by clustering in a biopolymer matrix, and their magnetic properties were studied.

The results obtained indicate the possibility of creating new magnetic polymer systems based on biocompatible polymers modified with the biogenic polyamine spermine, capable of incorporating drugs.

*The work was supported by the Foundation for the Advancement of Theoretical Physics and Mathematics “BASIS”.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-158

STRUCTURAL PECULIARITIES OF THE F₀F₁-ATP SYNTHASE PROTON HALF-CHANNELS IN MEMBRANES WITH DIFFERENT LIPID COMPOSITIONSL.A. Ivontsin¹, E. V. Mashkovtseva^{1,2}, Y.R. Nartsissov^{1,3}¹*Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow*²*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*³*Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Siek, Germany*

✉ ivontsin@icmph.ru

Abstract

Molecular dynamics simulations were used to study the membrane lipid composition influence on the proton half-channels structure of F₀F₁-ATP synthase. A possible network of polar amino acid residues and water molecules, which have a significant effect on proton transport, were described. The effect of cardiolipins on the structural dynamics of amino acid side chains and protein hydration was evaluated.

For the normal functioning living organisms need to constantly accumulate and transform adenosine triphosphate molecules (ATP), the main source of energy for many physiological processes. In cells, ATP synthesis is carried out mainly by the F₀F₁-ATP synthase protein complex, which is a unique energy converter using an electrochemical gradient of hydrogen ions. The membrane part of the enzyme is not a hollow pore, but two non-coaxial half-channels with a complex proton trajectory [1]. Precise data on the location and structure of the half-channels are still unknown, and experimental estimation of the proton transport parameters is challenging. However, molecular dynamics (MD) simulation will allow not only to study the structural features of half-channels in real biological conditions, but also to analyze the limits of adaptability of ATP synthase functioning in case of the biological membrane's damage.

To analyze the possible regions of proton transport, we performed MD simulations on microsecond time scale with the bacterial protein complex (PDB ID: 6VWK) [2] embedded in three types of membranes with different lipid compositions. In the present study, the model phosphatidylcholine (POPC) membrane, *in vivo* membrane containing 25 % cardiolipins (CL), as well as lipid bilayer with 75 % CL that corresponds to the conditions of bacterial stress were considered. CL are known to play a significant role in energy transducing processes maintaining the structure and functional activity of the ATP synthase.

The structure of proton half-channels, which turned out to be stable regardless of the membrane lipid composition, was described. Nevertheless, in model POPC membrane the insufficient probability of direct transitions between significant amino acid residues in the inlet half-channel, in combination with low protein hydration, indicated a high risk of proton transport instability. The presence of CL apparently increased the hydration of half-channels. We discovered the emergence of a long continuous chain of water molecules to pass a proton directly to key cAsp61 from the periplasm. Minor conformational changes in half-channels that occurred with addition of CL caused extremely rare direct transitions between aGlu219-aAsp119, aGlu219-aHis245 and aGln252-cAsp61. At the same time, deeper penetration of water molecules (W1-W3) also increased the proton transport continuity. Stable spatial positions (SP) of some amino acids side chains of the a-subunit in all types of membranes were founded. It has been established that aAsn214 in SP1 was oriented to aHis245, and in SP3 to cAsp61, change-over between which resembled the operation like a switcher between elements of an electric chain [3]. The independence of the intrachannel amino acid side chains dynamics from the simulation conditions indicates the prevailing influence of local electrostatic interactions.

The identified regions of possible proton pathway across the membrane allowed to put forward a microscopic model of the mechanism of proton movement in ATP synthases under conditions close to *in vivo* and to underline the importance of membrane composition in MD simulations. Further quantum-chemical calculations of the proton motion along the obtained trajectory will make it possible to estimate the parameters of proton transport, which are difficult to measure experimentally.

References

1. Walker J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown // *Biochemical Society Transactions*. 2013. Vol. 41. P. 1–16.
2. Sobti M. et al. Cryo-EM structures provide insight into how E. coli F1Fo ATP synthase accommodates symmetry mismatch // *Nature Communications*. 2020. Vol. 11. P. 2615.
3. Ivontsin L.A., Mashkovtseva E. V., Nartsissov Y.R. Insights on the proton translocation pathways in FoF1-ATP synthase using molecular dynamics simulations // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2022. Vol. 717. P. 109135.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-159

**ALBUMIN CONJUGATES AS MULTIMODAL CONTRAST AGENTS
FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING AND FLUORESCENCE IMAGING ***D. E. Mitin^{1,2}, A. S. Chubarov¹¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*

✉ d.mitin@g.nsu.ru

Abstract

Human serum albumin (HSA) is a major multifunctional protein in blood plasma. Albumin provides important features as a carrier platform. In this work we developed metal-free multimodal contrast agents based on HSA, stable nitroxide radicals and a fluorescent dye for magnetic resonance imaging (MRI) and fluorescence imaging.

Magnetic resonance imaging (MRI) is one of the diagnostic imaging techniques in medical practice and is often used to detect cancerous tumors. MRI images have excellent soft tissue contrast, but in some cases, it is problematic to determine the boundaries of the tumor. Therefore, in such cases, contrast agents are used. Especially popular are contrast agents based on chelate complexes or heavy metal oxides of such elements as Gd, Mn, Fe. Contrast agents based on heavy metals are toxic, have serious side effects and rather high price. Stable nitroxyl radicals can serve as an alternative to paramagnetic metal complexes in MRI diagnostics [1]. The main advantage of such contrast agents is that nitroxides contrast in the same way as classical contrast agents for ¹H MRI, and MRI registration can be performed on the same MR tomograph. Nevertheless, nitroxyl radicals have several disadvantages such as fast *in vivo* reduction and low relaxivity [1]. To solve these problems, HSA can be used as a transporter for molecular probes. HSA has the ability to accumulate in tumors by passive transport or by albumin-binding proteins and receptors, biocompatibility, biodegradability, and is easily modified and has a long circulation time in the body [2]. The optimal diagnostic methods to form a tandem with MRI is fluorescence tomography using fluorescent contrast agents. Due to limitations in the depth of penetration of emission into the tissue, fluorescence tomography is used as an imaging tool for control during surgery, allowing accurate delineation and complete removal of the tumor. The aim of this work is to develop metal-free multimodal contrast agents based on human serum albumin, stable nitroxide radicals and fluorescent dye for ¹H MRI and fluorescence tomography of cancer.

In our work, a new approach to the modification of albumin with nitroxides was developed. This approach is based on the combined presence of thiolactone and maleimide radical derivatives and their fractional addition to the reaction mixture. It was shown that the use of the present approach provides HSA modification with up to 25 residues of nitroxyl radicals, which was confirmed by EPR spectroscopy and MALDI-ToF mass spectrometry. In biological conditions, there is a problem of rapid reduction of nitroxyl radicals. When using HSA as a delivery system for sterically-hindered nitroxyl radicals, it is possible to reduce the reduction constants by hundreds of times compared to conjugates of nitroxides with dendrimers, which indicates their prolonged action. Modification of albumin can change the secondary structure, potentially leading to the formation of toxic beta-amyloid. To determine the content of alpha-helices and beta-sheets in the protein, we used the circular dichroism method. It was shown that in the conjugates of albumin and nitroxide radicals there is a slight decrease in alpha-helices and preservation of beta-sheets at the level of native protein. Using electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate, the absence of formation of potentially toxic aggregates was confirmed. MTT cytotoxicity test confirmed biocompatibility of HSA and nitroxyl radicals conjugates. Relaxivities r_1 and r_2 indicate the level of sensitivity in the registration of T_1 - and T_2 -weighted MRIs. The r_1 and r_2 values for contrast agents based on nitroxide radicals are comparable to those for paramagnetic contrast agent based on Gd³⁺ complex. To confirm the obtained data, phantom MRI were registered *in vitro*.

References

1. Dobrynin S., Kutseikin S., Morozov D. et al. Human Serum Albumin Labelled with Sterically-Hindered Nitroxides as Potential MRI Contrast Agents // *Molecules*. 2020. Vol. 15. P. 1–15.
2. Mitin D., Chubarov A. Fluorinated Human Serum Albumin as Potential 19F Magnetic Resonance Imaging Probe // *Molecules*. 2023. Vol. 20. P. 1–20.

* The research was financially supported by RSF, project № 21-74-00120.

© D. E. Mitin, A. S. Chubarov, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-160

THE STUDY OF THE SURVIVAL OF HUMAN MICROBIOME INTESTINAL BACTERIA AFTER CRYOPRESERVATION IN LIQUID NITROGEN*

L. V. Zalomova, E. E. Fesenko Jr.

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino

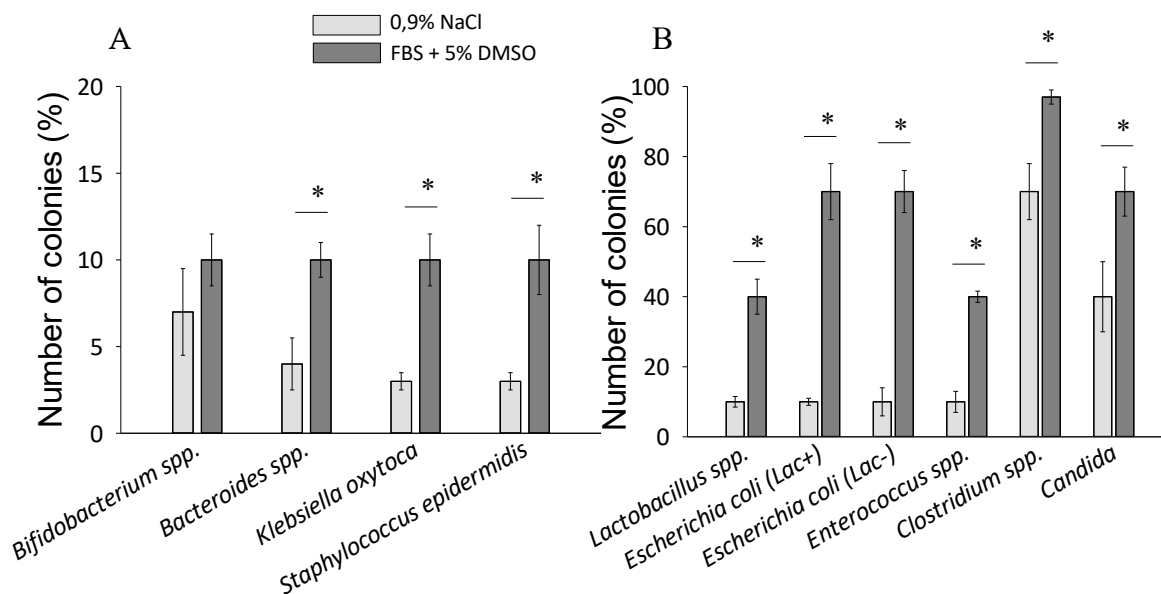
✉ zalomova.91@mail.ru

Abstract

A concept on gut microbiota as one of the key players in maintaining the human health is becoming more and more actual [1, 2]. Currently two main strategies can be distinguished in gut microbiota valuable biological matter application in the therapy of various pathologies, transplantation and application of probiotic medications, which both are focused on restoration of balance of microorganisms. In this regard, development of new methods for long-term conservation of microbiota providing high conservation degree of species and quantitative composition and quantitative parity of the bacteria forming the microbiocenosis is more and more relevant.

We estimated [3] the current state of the problem of human intestinal microbiome cryopreservation, reflecting the main goals of cryopreservation, modern approaches to preservation of complex microbial communities, as well as the methods for assessing the viability of microbial communities.

Studies have been carried out to assess the survival of 10 target bacterial species of the human gut microbiota in the process of cryopreservation in liquid nitrogen using promising cryoprotective combination — FBS (fetal bovine serum) + 5 % DMSO. FBS, used only for the conservation of eukaryotic cells, previously we were applied to bacterial associations with a high (> 80 %) survival rate of the whole donor microbiota during cryopreservation, and also monocultures of bacteria *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* [4]. Method of microbiological cultivation whole donor microbiota on selective solid media was used. High efficiency of two-component cryoprotective composition FBS + 5 % DMSO application upon cryopreservation of a panel of facultatively anaerobic (*Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*), microaerophilic (*Lactobacillus spp.*) and obligate anaerobic bacterial cultures (*Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*), differing also in cell wall composition (Gram positive, Gram negative), was demonstrated (see Figure). The change number colonies of bacterial cells when using combination FBS and DMSO compared with initial control did not exceed one order. The approach with use of two equally effective cryoprotective agents in combination increases the chances for successful cryopreservation of the microbial community as a whole.



Viability of key microorganisms of gut microbiota after cryopreservation (−196 °C, 4 days) compared to the initial cell content — 100 %, according to Mann — Whitney U-test

*The research was financially supported by Russian Foundation for Basic Research, project № 19-34-90187.
© L. V. Zalomova, E. E. Fesenko, 2023

References

1. Fuentes S., Rossen N. G., van der Spek M. J. et al. Microbial shifts and signatures of long-term remission in ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation // *J. ISME*. 2017. Vol. 11. P. 1877–1889.
2. Luna R. A., Foster J. A. et al. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression // *Curr. Opin. Biotechnology*. 2015. Vol. 32. P. 35–41.
3. Smirnova D. V., Zalomova L. V., Zagainova A. V. et al. Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives // *Intern. J. of Medical Microbiol.* 2019. Vol. 309. P. 259–269.
4. Zalomova L. V., Reshetnikov D. A., Ugraitskaya S. V. et al. Fetal serum in combination with 5 % dimethyl sulfoxide effectively protects the human gut microbiota during cryopreservation in liquid nitrogen // *Biophysics*. 2021. Vol. 66. P. 657–664.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-161

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЕНДРИМЕРОВ С МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМ ЯДРОМ
ДЛЯ ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК*****PROSPECTS FOR USING THE DENDRIMERS WITH A MACROCYCLIC CORE
FOR THE DELIVERY OF SMALL INTERFERING RNAs**В. М. Абашкин¹, А. И. Становая¹, И. Э. Шибиев², П. Л. Падня², И. И. Стойков², Д. Г. Щербин¹¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск²Химический институт им. А. М. Бутлерова, Казанский федеральный университетV. M. Abashkin¹, A. I. Stanavaya¹, I. E. Shiabiev², P. L. Padnya², I. I. Stoikov², D. G. Shcharbin¹¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of NASB, Minsk²Butlerov Chemical Institute, Kazan Federal University

✉ viktar.abashkin@gmail.com

Аннотация

Тиакаликс[4]арены — макроциклические соединения, представляющие собой удобную платформу для создания наноструктурных объектов, которые возможно применять в том числе в биомедицинских технологиях. В наших исследованиях мы провели анализ эффективности применения дендронизированных тиакаликс[4]аренов в качестве векторов для доставки малых интерферирующих РНК в опухолевые клетки *in vitro*.

Abstract

Thiacalix[4]arenes are macrocyclic compounds capable of serving as a flexible platform for the creation of nanostructured objects for biomedical applications. In our studies, we analyzed the efficiency of using the dendronized thiacalix[4]arenes as vectors for the delivery of small interfering RNAs to tumor cells *in vitro*.

На современном этапе развития клинической медицины разработано большое количество противоопухолевых агентов и их комбинаций, однако возникающие побочные эффекты существенно ухудшают качество жизни пациентов и имеют дозозимитирующий характер. Использование систем адресной доставки является одним из действующих способов избежать проблем классических лекарственных препаратов таких, как низкая избирательность, короткая продолжительность действия, аллергенность, а также высокая токсичность.

Использование синтетических наночастиц и наноструктур различной природы рассматриваются исследователями как возможный способ адресной доставки широкого спектра препаратов. Достаточно интересными объектами в этой области являются дендримеры — сверхразветвленные симметричные полимеры, функции которых можно строго варьировать в зависимости от поставленной задачи. С другой стороны, класс макроциклических соединений — тиакаликсаренов — также привлекает внимание возможностью легкой функционализации различными участками связывания.

В нашей работе были получены комбинированные наночастицы полиамидоаминных (ПАМАМ) дендримеров, в которых ядро было замещено тиакаликс[4]ареном в конформации *1,3-альтернат*. Такая структура наиболее близка к классическим дендримерам, имеет симметричную форму и, в зависимости от генерации (т. е. числа ветвлений) дендронов, обладает свойствами как дендримеров, так и тиакаликс[4]аренов.

Полученные дендронизированные тиакаликс[4]арены были исследованы в качестве векторов для малых РНК — специфических РНК, способных «выключать» экспрессию белков на стадии трансляции. Классические ПАМАМ-дендримеры имеют оптимальные свойства для доставки при 5–6-й генерации, однако использование высоких генераций дендримеров сопряжено с высокой токсичностью, кроме того, контроль синтеза дендримеров таких генераций осложнен из-за высокой молекулярной массы соединений. В случае дендронизированных тиакаликс[4]аренов высокая эффективность связывания и доставки малых РНК наблюдается уже и в случае 1-й генерации, в то время как классические ПАМАМ-дендримеры проявляют способность к связыванию и доставке только при 3-й генерации и выше.

В то время как ПАМАМ-дендримеры низких генераций, как правило, не инициируют гибель клеток, наши соединения тем не менее проявляют токсичность в отношении как клеток крови, так и перевиваемых клеточных

* Работа выполнена при поддержке грантов БРФФИ № Б21РМ-045, РФФИ № 20-53-04019 (Бел_мол_а).

© В. М. Абашкин, А. И. Становая, И. Э. Шибиев, П. Л. Падня, И. И. Стойков, Д. Г. Щербин, 2023

линий, однако токсические эффекты наблюдаются лишь при концентрациях, превышающих 50 мкМ, что на порядок выше концентраций, используемых непосредственно при доставке миРНК. Возникающие токсические эффекты связаны, по всей видимости, с особенностями структуры дендронизированных тиакаликс[4]аренов, где дендроны обладают большим количеством степеней свободы, а значит более эффективно взаимодействуют с клеточными мембранами и белками.

Также интересен тот факт, что исследуемые дендронизированные тиакаликс[4]арены не во всех случаях проявляют эффекты, зависящие от генерации, в отличие от классических дендримеров. Это связано с влиянием тиакаликсаренового ядра, свойства которого более явно проявляются при низких генерациях, в то время как при более высоких характер физико-химических параметров данных соединений ближе к классическому поведению дендримеров. Так, для дендронизированные тиакаликс[4]арены 1-й генерации ярко выражены свойства тиакаликсаренового остова, в то время как соответствующие соединения 3-й генерации уже ведут себя сходным образом с классическими дендримерами. Дендронизированные тиакаликс[4]арены 2-й генерации соответственно занимают промежуточное положение.

Таким образом, полученные дендронизированные тиакаликс[4]арены обладают высоким потенциалом в качестве носителей для миРНК, однако в настоящее время остается нерешенной задача высвобождения достаточного уровня целевого продукта внутри клеток, что может быть связано с высокой плотностью образуемых комплексов. Данную цель коллектив авторов планирует решить с использованием специфических поверхностных модификаций дендримеров, которые позволят более тонко настроить их свойства и повысить не только выход целевых соединений, но и еще сильнее снизить возникающие токсические эффекты.

Литература

1. Mostovaya O. et al. PAMAM-calix-dendrimers: Second generation synthesis, fluorescent properties and catecholamines binding // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 1, № 12. P. 2748.
2. Shiabiev I.E. et al. First-Generation Dendrimers Based on Thiocalix [4] arene Containing Hydroxyl Terminal Groups: Synthesis and Self-Assembly // *Russian Journal of General Chemistry*. 2022. Vol. 92, № 12. P. 2574–2581.
3. Mostovaya O. et al. PAMAM-calix-dendrimers: Synthesis and thiocalixarene conformation effect on DNA binding // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 21. P. 11901.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-162

СВЯЗЬ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДВИЖНОСТИ *L. MONOCYTOGENES* С ИНВАЗИЕЙ В КЛЕТКИ HEP-2**RELATIONSHIP OF *L. MONOCYTOGENES* MOTILITY CHARACTERISTICS WITH INVASION INTO HEP-2 CELLS**

М. М. Абдулкадиева^{1,2}, В. В. Литвиненко¹, Е. В. Васильева¹,
Е. В. Сысолятина², С. А. Ермолаева²

¹Объединенный институт высоких температур РАН, Москва

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

M. M. Abdulkadieva^{1,2}, V. V. Litvinenko¹, E. V. Vasilyeva¹,
E. V. Sysolyatina², S. A. Ermolaeva²

¹Joint Institute of High Temperatures RAS, Moscow

²Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ maryam094@yandex.ru

Аннотация

Способность бактерий к движению позволяет свободноживущим микроорганизмам распространяться и осваивать новые места обитания, а патогенным реализовывать свою вирулентность. К характеристикам подвижности бактериальных клеток относят траектории, скорости и способность к коллективному движению. Для штаммов кишечной палочки показано, что эти характеристики влияют на адгезию к абиотическим и биотическим поверхностям [1]. Цель работы — оценка вклада подвижности *L. monocytogenes* в инвазию в клетки HEP-2.

Abstract

The motility allows free-living microorganisms to spread and develop new habitats, and pathogenic ones to realize their virulence. The characteristics of the motility of bacterial cells include trajectories, speeds and collective movement. It has been shown for *E. coli* strains, that these characteristics affect adhesion to abiotic and biotic surfaces [1]. The aim of the work is to investigate the contribution of *L. monocytogenes* motility to HEP-2 cells to invasion.

Материалы и методы

В работе использовали подвижные патогенные *L. monocytogenes* EGDe и сапрофитические *L. innocua* SLCC 3379. Бактерии рутинно инкубировали в питательной среде (BHI) при 22 °С. В качестве контроля использовали неподвижный штамм *L. monocytogenes*, выращенный при 37 °С. В экспериментах по оценке вклада подвижности в инвазию листерий инкубировали 18 ч при 22 °С, а затем переводили на 2 ч в инкубатор с температурой 37 °С для активации факторов патогенности (подвижные* *L. monocytogenes*).

Для анализа характеристик движения бактериальную суспензию с оптической плотностью $OD_{600} = 2$ помещали в микрофлюидическую камеру так, чтобы высота слоя жидкости составляла 30 мкм, после чего делали серию видеозаписей. Полученные данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Plasma 4.0, что позволило восстановить траектории приповерхностного движения бактерий на расстоянии около 10-15 мкм от дна камеры.

Микрофотографии паттернов адгезии были получены при помощи флуоресцентной микроскопии после 15 и 60 мин инкубации микроорганизмов на поверхности пластика и эукариотических клеток линии HEP-2.

Для оценки эффективности адгезии бактериальную суспензию вносили в лунки планшета с клетками HEP-2 и инкубировали 15 и 60 мин. Лунки трижды промывали, лизировали эукариотические клетки и делали высевы. Оценку эффективности инвазии подвижных* и неподвижных *L. monocytogenes* в клетки HEP-2 проводили с помощью гентамицинового теста [2].

Результаты

Было установлено, что подвижные *L. monocytogenes* и *L. innocua* проявляли сходные черты коллективного направленного движения, их средние медианные скорости составляли 20 ± 5 мкм/с при среднем времени

пребывания в слое ~ 1 с, за которое они проходили 8 ± 3 мкм. Движение неподвижных листерий имело характер диффузии с увеличенным вдвое средним временем пребывания в слое.

Подвижность улучшала эффективность адгезии бактерий к эпителиальным клеткам. Так, после 15- и 60-минутной инкубации количество адгезировавшихся бактерий было в два раза выше у подвижных штаммов, по сравнению с неподвижным ($p < 0,05$) (рис 1, А).

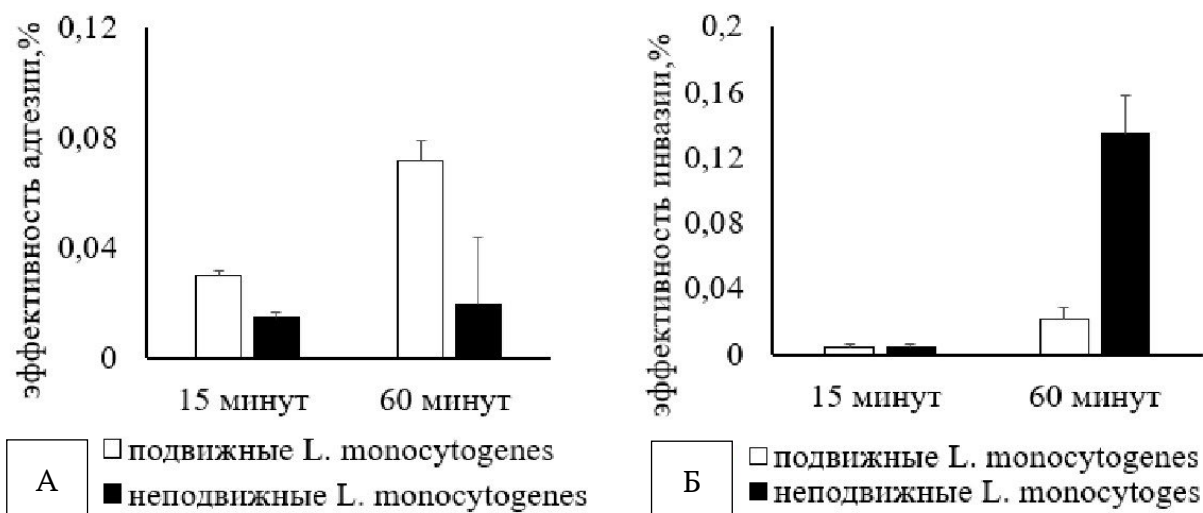


Рис. 1. А — Эффективность адгезии неподвижных и подвижных *L. monocytogenes*. Б — Эффективность инвазии неподвижных и подвижных* *L. monocytogenes* (с активированными факторами патогенности)

Также было показано, что эффективность инвазии подвижных* *L. monocytogenes* была в 8,7 раз ($p < 0,05$) выше, чем неподвижных (см. рис. 1, Б). Последние по поверхности эпителиальных клеток были распределены случайным образом, а подвижные бактерии располагались ближе к периферии (рис. 2).

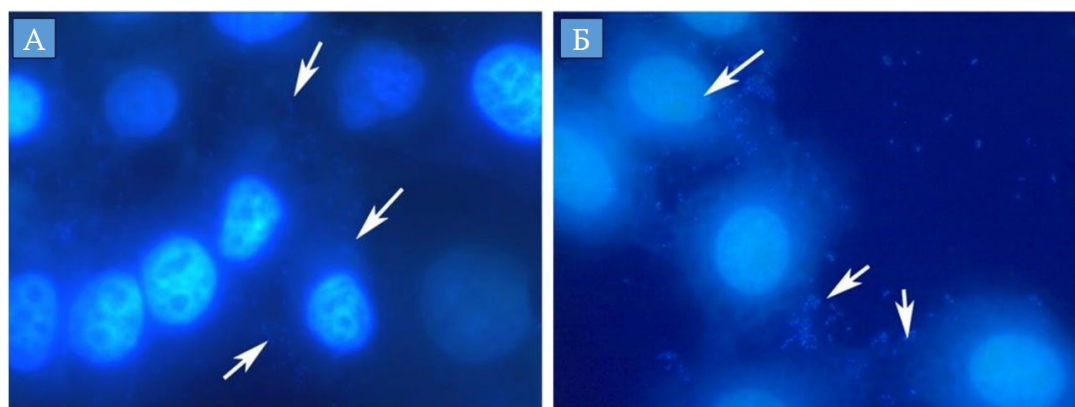


Рис. 2. Распределение подвижных (А) и неподвижных (Б) листерий по поверхности эукариотических клеток

Выводы

1. Установлено, что паттерны приповерхностного движения листерий не отличались для патогенных и непатогенных видов.
2. Подвижные листерии концентрировались в основном у периферии клетки.
3. Подвижные листерии более эффективно проникали внутрь клеток-мишеней, что, возможно, связано с лучшим взаимодействием с рецепторами Е-кадгерина и индукцией эндоцитоза.

Литература

1. Abdulkadieva M. M. et. al. Strain specific motility patterns and surface adhesion of virulent and probiotic *Escherichia coli*. // Sci. Rep. 2022. № 12 (1). P. 61412.
2. Vaudaux P, Waldvogel F.A. Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes // Antimicrob. Agents Chemother. 1979. № 16 (6). P. 743.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-163

**ЭФФЕКТЫ ДОНОРА NO НА СОКРАТИМОСТЬ МИОКАРДА МЫШЕЙ
С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ*****EFFECTS OF NO DONOR ON MYOCARDIAL CONTRACTILITY IN MOUSE
WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA**

П. И. Адюкина, Р. Г. Каримова

Казанский федеральный университет

P. I. Adyukina, R. G. Karimova

Kazan Federal University

✉ adyukina.polina@mail.ru

Аннотация

Изучена сократимость миокарда мышей с гипергомоцистеинемией под влиянием донора оксида азота. Установлено отсутствие отрицательного инотропного действия (нитропруссид натрия, 1000 мкМ/л) при гипергомоцистеинемии.

Abstract

The contractility of the myocardium of mouse with hyperhomocysteinemia under the influence of a nitric oxide donor was studied. The absence of a negative inotropic effect (sodium nitroprusside, 1000 μM/l) was found in hyperhomocysteinemia.

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) — это повышение уровня гомоцистеина в плазме крови организма до 15 мкМ/л и более. Данный дисбаланс связан с нарушением процесса выведения гомоцистеина, т. е. катаболизма, и его биосинтезом [1]. Гипергомоцистеинемия является непосредственным фактором развития атеросклероза, приводящего к сердечно-сосудистым заболеваниям. Гомоцистеин (ГЦ) способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний через процессы, которые запускают тромбогенез, пролиферацию мышечных клеток сосудов, снижение циркуляции липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), превращение в ГЦ-тиолактон [2].

Оксид азота (NO) играет важную роль в физиологии сердца, включая регуляцию сократительной способности миокарда и коронарного кровотока, а также в патофизиологии сердца, особенно при ишемии. Большинство сердечно-сосудистых заболеваний связаны с дисфункцией NO, а повышение биодоступности и передачи сигналов NO является потенциальным терапевтическим подходом к сердечно-сосудистым заболеваниям.

Доказано, что оксид азота в различных моделях с повышением уровня гомоцистеина снижает свою концентрацию, т. е. ГЦ действует на него как фактор, подавляющий синтез. ГЦ снижает доступность оксида азота и оказывает вторичное активирующее действие на синтез NO [3].

ГЦ действует на сосуды, контролируя сократительную способность гладкомышечных клеток сосудов и проницаемость эндотелиальных клеток посредством ингибирования эндотелиальной синтазы оксида азота, которая продуцирует оксид азота (NO). Более того, гомоцистеин снижает экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота, что приводит к сердечным аритмиям [4].

Следовательно, на сегодняшний день остро стоит вопрос изучения механизма действия газомедиаторов, в частности оксида азота, на деятельность сердца.

Цель исследования — выявить эффекты донора NO на сократительную активность миокарда мышей с гипергомоцистеинемией.

Эксперименты были проведены на 20 нелинейных 1,5-месячных лабораторных самцах мышей. В течение трех недель мышам опытной группы вводили внутривенно 10%-ю суспензию метионина ежедневно в дозе 1,5 г/кг. Воду в поилках заменяли на 1%-й раствор метионина. Контрольной группе мышей внутривенно вводили эквивалентный объем питьевой воды. Сократимость миокарда изучали на полосках тензометрическим методом при стимуляции электрическим током.

В качестве донора NO использовали нитропруссид натрия (нитропруссид Na) фирмы Sigma. Запись, анализ и обработка экспериментов по сократимости миокарда осуществлялись при помощи программ Elph_5p0 и OriginPro 8.5 с помощью непараметрического U-критерия Манна — Уитни и Уилкоксона.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-26-00167.

© П. И. Адюкина, Р. Г. Каримова, 2023

Донор NO (нитропруссид Na) оказывает дозозависимый эффект на сократимость миокарда предсердий и желудочков мыши: в концентрации 100 мкМ/л повышает амплитуду сокращений в среднем в 1,26 раз ($p < 0,05$), в концентрации 1000 мкМ/л — снижает в 1,5 раза ($p < 0,05$).

У мышей с гипергомоцистеинемией положительный инотропный эффект нитропруссид Na (100 мкМ/л) был более выражен относительно контроля (амплитуда сокращений миокарда желудочка повышалась в 1,4 раза ($p < 0,05$), амплитуда сокращения предсердий — в 2,0 раза ($p < 0,05$)).

Апликация нитропруссид Na (1000 мкМ/л) на полоски миокарда мышей с гипергомоцистеинемией не вызвала изменений амплитуды сокращения предсердий и желудочков, в отличие от контроля, где значения уменьшились.

Таким образом, отрицательный инотропный эффект оксида азота при гипергомоцистеинемии не проявляется.

Литература

1. Медведев Д. В., Звягина В. И. Изучение дисфункций митохондрий кардиомиоцитов в условиях гипергомоцистеинемии и дефицита оксида азота // Казанский медицинский журнал. 2015. Т. 96, № 5. С. 837–843.
2. Каражанова Л. К., Жунуспекова А. С. Гипергомоцистеинемия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (Обзор литературы) // Наука и здравоохранение. 2016. № 4. С. 129–144.
3. Манухина Е. Б., Малышев И. Ю., Бувальцев В. И. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия: механизмы и пути коррекции // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2003. Т. 2 (4). С. 36–40.
4. Дубченко Е. А., Иванов А. В., Бойко А. Н. и др. Гипергомоцистеинемия и эндотелиальная дисфункция при сосудистых и аутоиммунных заболеваниях головного мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2019. 119 (11). С. 133–138.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-164

**СПЕКТРОСКОПИЯ ^{19}F -ЭЛЕКТРОН-ЯДЕРНОГО ДВОЙНОГО РЕЗОНАНСА
ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ РАССТОЯНИЙ В ДНК-ДУПЛЕКСАХ*** **^{19}F -ELECTRON NUCLEAR DOUBLE RESONANCE (ENDOR) SPECTROSCOPY
FOR DISTANCE MEASUREMENTS IN DNA-DUPLEXES**

Н. Б. Асанбаева¹, Д. С. Новопашина², О. Ю. Рогожникова¹, В. М. Тормышев¹, А. А. Суханов³,
А. В. Шернюков¹, А. М. Генаев¹, А. А. Ломзов², А. Кель⁴, М. Беннати^{4,5}, А. Мейер^{4,5}, Е. Г. Багрянская¹

¹Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³Казанский физико-технический институт им. Е. К. Завойского ФИЦ КазНЦ РАН

⁴Институт междисциплинарных наук им. Макса Планка, Геттинген, Германия

⁵Геттингенский университет им. Георга Августа, Германия

N. B. Asanbaeva¹, D. S. Novopashina², O. Yu. Rogozhnikova¹, V. M. Tormyshev¹, A. A. Sukhanov³,
A. V. Shernyukov¹, A. M. Genaev¹, A. A. Lomzov², A. Kehl⁴, M. Bennati^{4,5}, A. Meyer^{4,5}, E. G. Bagryanskaya¹

¹Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³Zavoisky Physical-Technical Institute, FRC KazSC RAS, Kazan

⁴Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences, Göttingen, Germany

⁵Georg August University of Göttingen, Germany

✉ nargiz-asan@mail.ru

Аннотация

Комбинация ^{19}F -мечения и импульсного электрон-ядерного двойного резонанса (ДЭЯР) является мощным методом получения структурной информации о биомолекулах. В данной работе мы продемонстрировали возможности экспериментов Mims ^{19}F -ДЭЯР по измерению межмолекулярных расстояний в тритил- и ^{19}F -меченых дуплексах ДНК при трех частотах электронного парамагнитного резонанса (34, 94 и 263 ГГц).

Abstract

The combination of ^{19}F -labeling and pulsed electron-nuclear double resonance (ENDOR) is a powerful method for obtaining structural information about biomolecules. In this work, we demonstrated the capability of Mims ^{19}F -ENDOR experiments on measuring intermolecular distances in trityl- and ^{19}F -labeled DNA duplexes at three electron paramagnetic resonance frequencies (34, 94, and 263 GHz).

Ранее уже было показано, что спектроскопия ДЭЯР на частотах W- и J-диапазона (94 и 263 ГГц) для пары меток (нитроксильный радикал и ^{19}F) позволяет измерять короткие (0,5–1,5 нм) расстояния в биомолекулах [1, 2]. В нашей работе в качестве электронных спиновых меток были использованы гидрофобный триарилметильный радикал типа Finland и гидрофильный тритильный радикал OX063. Фторсодержащие метки были введены в два концевых олигонуклеотида ДНК-дуплекса. Результаты экспериментов Mims ^{19}F -ДЭЯР на меченых ДНК-дуплексах показали, что даже грубая оценка расстояния между центром введенного тритила и атомом фтора по экспериментальным спектрам находится в пределах достоверности. Для описания полученных спектров ДЭЯР было выполнено моделирование молекулярной динамики и получена более детальная информация о конфигурации тритилов на концевых участках ДНК.

Литература

1. Meyer A., Dechert S., Dey S., Höbartner C., Bennati M. Measurement of Angstrom to Nanometer Molecular Distances with ^{19}F Nuclear Spins by EPR/ENDOR Spectroscopy // *Angew. Chemie. Int. Ed.* 2020. Vol. 59. P. 373–379.
2. Kehl A., Hiller M., Hecker F. et al. Resolution of Chemical Shift Anisotropy in ^{19}F -ENDOR Spectroscopy at 263 GHz/9.4 T. // *J. Magn. Reson.* 2021. Vol. 333. P. 107091.

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-14-00219.

© Н. Б. Асанбаева, Д. С. Новопашина, О. Ю. Рогожникова, В. М. Тормышев, А. А. Суханов, А. В. Шернюков, А. М. Генаев, А. А. Ломзов, А. Кель, М. Беннати, А. Мейер, Е. Г. Багрянская, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-165

**ПЭГ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ
И ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ***

**PEG-COATED GOLD NANOPARTICLES AND PROSPECTS OF THEIR USE FOR ENHANCING COLD
PLASMA CYTOTOXIC EFFECT AND FOR DRUG MOLECULES DELIVERY TO TUMOR CELLS**

М. М. Бирюков¹⁻³, А. А. Полякова¹⁻³, Н. В. Крячкова¹⁻³, Е. А. Горбунова^{1,3},
Е. В. Милахина³, Д. Э. Закревский³, И. В. Швейгер³, О. А. Коваль¹⁻³

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

³Институт теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

M. M. Biryukov¹⁻³, A. A. Polyakova¹⁻³, N. V. Kryachkova¹⁻³, E. A. Gorbunova^{1,3},
E. V. Milakhina³, D. E. Zakrevsky³, I. V. Schweigert³, O. A. Koval¹⁻³

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

³Khrstianovich Institute of Theoretical and Applied Mechanics SB RAS, Novosibirsk

✉ biryukov.mm@ya.ru

Аннотация

В ходе работы показано, что наночастицы золота диаметром 6 и 13 нм способны усиливать цитотоксический эффект холодной плазмы в отношении опухолевых клеток человека. Холодная плазма также способствует захвату опухолевыми клетками наночастиц, конъюгированных с изотиоцианатом флуоресцеина. Комбинация наночастиц золота и холодной плазмы может быть использована для доставки терапевтически важных молекул в клетки.

Abstract

Gold nanoparticles with diameters of 6 and 13 nm have been found to enhance the cytotoxic effect of cold plasma on human tumor cells. Additionally, cold plasma has been shown to promote the uptake of gold nanoparticles that are conjugated with fluorescein isothiocyanate by tumor cells. Gold nanoparticles can be utilized in conjunction with cold plasma to deliver drug molecules to cells.

Холодная плазма (ХП) представляет собой поток заряженных и незаряженных частиц с температурой, не превышающей 40 °С. ХП способна оказывать широкий спектр биологических эффектов на живые системы за счет воздействия на окислительно-восстановительный баланс клеток. За последние несколько лет достигнут большой прогресс в изучении биологических эффектов холодной плазмы, в том числе в области борьбы с онкотрансформированными клетками. Так, была показана способность ХП стимулировать гибель опухолевых клеток как *in vitro* в культуре, в том числе в 3D-моделях, так и *in vivo* в мышцах-опухоленосителях. Кроме того, перспективным является применение ХП в комбинации с другими средствами противоопухолевой терапии, например ингибиторами ферментов, антителами, малыми интерферирующими РНК, а также с наноматериалами. Наночастицы золота (НЧЗ) являются одним из наиболее изученных объектов среди наноматериалов. Современные методики синтеза позволяют получать монодисперсные частицы разных размеров, а также модифицировать поверхность частиц молекулами разной природы как с помощью ковалентных связей, так и при помощи адсорбции. НЧЗ можно использовать как для терапевтических целей в случае присоединения к ним молекул лекарственных средств, так и в качестве инструментов для исследования.

Целью данной работы было изучение влияния наночастиц золота на цитотоксичность холодной плазмы в отношении опухолевых клеток, а также исследование динамики проникновения наночастиц в клетки.

В работе использовали генератор холодной плазмы, разработанный в Институте физики полупроводников СО РАН. НЧЗ диаметром 6 и 13 нм без покрытия, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ), а также конъюгированные с изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) были синтезированы в Лаборатории структурной биологии ИХБФМ

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-49-08003.

СО РАН. Биологические эффекты холодной плазмы и НЧЗ изучали на культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549 и NCI-H43.

Использование НЧЗ диаметром как 6, так и 13 нм, покрытых ПЭГ, способствовало усилению цитотоксичности воздействия ХПС на клетки при обработке в течение 1 и 2 мин. Наибольший цитотоксический эффект достигался при концентрации НЧЗ диаметром 13 нм, равной 20 пМ. При обработке клеток в течение 30 с и менее не удалось выявить достоверного изменения жизнеспособности клеток.

Известно, что воздействие ХПС способно индуцировать захват обработанными клетками молекул из внеклеточного окружения. Этот процесс может быть обусловлен образованием пор в мембранах клеток или же усилением эндоцитоза. Для исследования процессов захвата наночастиц были использованы конъюгаты НЧЗ-ПЭГ-FITC, которые добавляли к клеткам сразу и через 0,5–4 ч после обработки клеток ХП после обработки ХПС. Через час после добавления конъюгатов оценивали количество положительных по сигналу в канале FITC клеток методом проточной цитофлуориметрии. Результаты показали, что до 20–30 % клеток содержали НЧЗ-ПЭГ-FITC при добавлении к клеткам через 0–3 ч после обработки ХП. Интенсивность захвата клетками НЧЗ-ПЭГ-FITC увеличивалась в течение первого часа.

Таким образом, наночастицы золота способны под действием холодной плазмы проникать в клетки и усиливать цитотоксичность воздействия ХП. НЧЗ-ПЭГ в комбинации с холодной плазмой можно использовать для доставки в клетки терапевтически значимых молекул, например siРНК и антител. Кроме того, планируются более детальные исследования механизма захвата клетками наночастиц золота.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-166

**УСКОРЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ НЕТКАНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ
НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА*****ACCELERATION OF PLA-BASED NONWOVENS' DEGRADATION**А. С. Богданова^{1,2}, Е. Р. Павлова², А. Ю. Полянская¹, М. В. Волкова¹,
Е. С. Бирюкова¹, М. О. Дурьманов^{1,3}, Д. В. Клинов^{1,2}, Д. В. Багров^{2,4}¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА
им. акад. Ю. М. Лопухина, Москва³Химический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова⁴Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. ЛомоносоваA. S. Bogdanova^{1,2}, E. R. Pavlova², A. Yu. Polyanskaya¹, M. V. Volkova¹,
E. S. Biryukova¹, M. O. Durymanov^{1,3}, D. V. Klinov^{1,2}, D. V. Bagrov^{2,4}¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny²Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine FMBA, Moscow³Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University⁴Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University

✉ bogdanova.as@phystech.edu

Аннотация

Управление временем биодegradации полимерных материалов — важный этап в разработке имплантатов и других биомедицинских изделий. В данной работе мы предлагаем способ ускорения деградации матрикса из полилактида путем введения малой доли белка. Такие смешанные матриксы не только продемонстрировали ускоренную деградацию *in vivo*, но и не уступали в прочности и растяжимости однокомпонентным матриксам.

Abstract

Managing polymer material biodegradation time is a substantial part of biomaterial development. Here, we introduce the inclusion of a small protein fraction as a way of accelerating the polylactide mats' degradation. These blended mats demonstrated faster *in vivo* degradation while maintaining the strength and extensibility of the one-component mats.

Электроспиннинг — простой и гибкий метод изготовления полимерных нетканых нановолоконных материалов, имитирующих внеклеточный матрикс [1]. В качестве сырья для таких материалов часто используются биодegradируемые полиэфиры. Полилактид является простейшим и наиболее широко используемым из них. Однако из-за гидрофобности материалов из полилактида и возникновения локального окисления при их биодegradации нарушается клеточная адгезия, выживаемость и пролиферация [2].

Одним из способов улучшения биологических свойств полиэфирных матриксов является электроспиннинг полиэфигов в сочетании с биополимерами, например белками. Однако это часто негативно сказывается на их механических свойствах [3]. Увеличение скорости биодegradации нетканых полиэфирных материалов при сохранении их физико-химических свойств способно значительно расширить их применимость в качестве матриксов для тканевой инженерии.

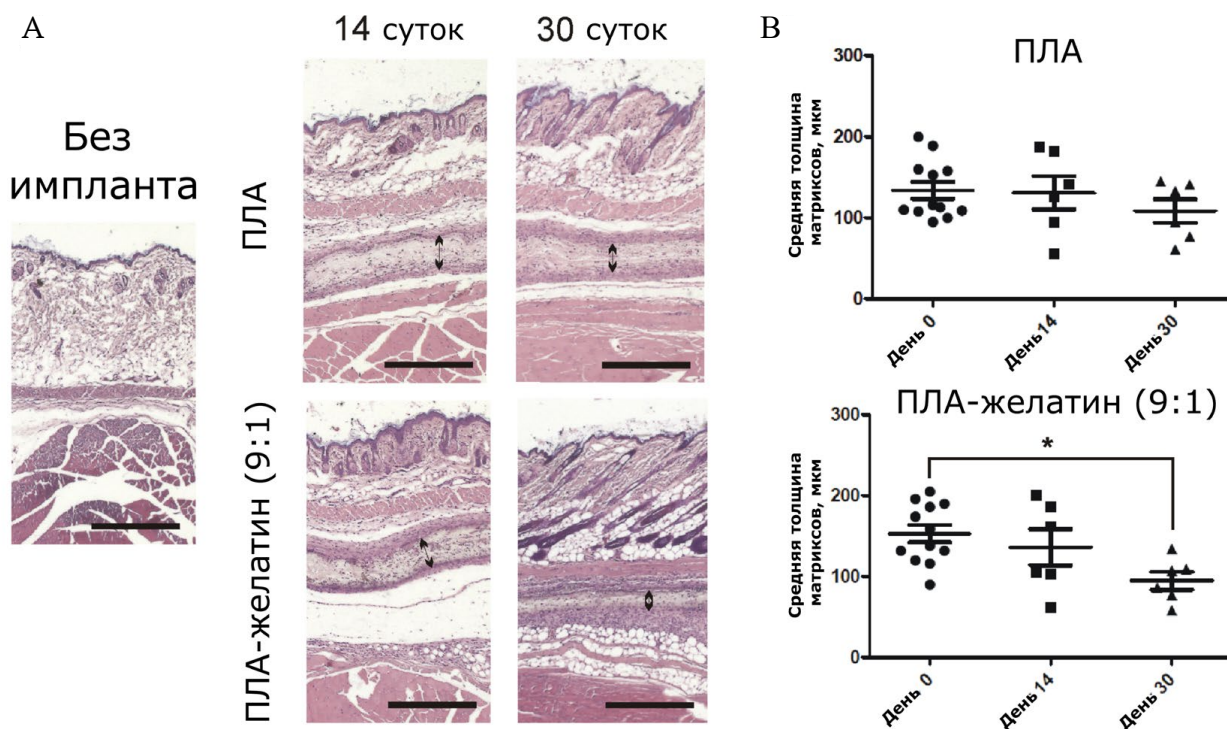
В рамках данной работы методом электроспиннинга были изготовлены матриксы из растворов полилактида (ПЛА) и смеси ПЛА-желатин (9:1) в гексафторизопропанолe с концентрацией 150 мг/мл. Полученные материалы были подробно охарактеризованы с точки зрения морфологии, гидрофильности, механических свойств и биосовместимости. Механические испытания проводились для матриксов в сухом и влажном состояниях, поскольку биоматериалы используются в контакте с биологическими жидкостями. Материалы из смеси ПЛА-желатин (9:1) стали в 2 раза пластичнее после увлажнения. Более того, материалы из смеси ПЛА-желатин (9:1) продемонстрировали более высокую прочность, которая хотя и снижается во влажном состоянии, но остается выше, чем у материалов из ПЛА без добавок. Культивирование фибробластов линии 3T3 на поверхности описываемых

* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № 075-03-2023-106, проект № FSMG-2023-0015.

© А. С. Богданова, Е. Р. Павлова, А. Ю. Полянская, М. В. Волкова, Е. С. Бирюкова, М. О. Дурьманов, Д. В. Клинов, Д. В. Багров, 2023

материалов не выявило статистически значимых отличий в скорости пролиферации и цитотоксичности ни между материалами разных типов, ни по сравнению с культуральным пластиком [4].

Значительная часть работы была посвящена исследованию *in vitro* и *in vivo* деградации полученных материалов. *In vitro* деградация моделировалась методом инкубации образцов в течение 8 недель в фосфатно-солевом буфере и реактиве Фентона при 37 °С. Образцы обоих составов независимо от инкубационного раствора за 8 недель потеряли порядка 10 % массы. Скорость *in vivo* деградации определяли путем сравнения толщины образцов описываемых материалов до подкожной имплантации мышам, а также на 14 и 30-й день после нее. Оба типа имплантированных материалов постепенно замещались соединительной тканью и не вызывали выраженной воспалительной реакции. В то же время образцы материала из смеси ПЛА-желатин (9:1) спустя 1 месяц имплантации статистически достоверно стали на 30 % тоньше, тогда как толщина образцов из ПЛА без добавок уменьшилась лишь на 10 % (см. рисунок).



Анализ *in vivo* биodeградации нетканых материалов из ПЛА и смеси ПЛА-желатин (9:1): А — гистологические изображения образцов материалов на 14-й и 30-й день после подкожной имплантации мышам C57black/6. Двусторонняя стрелка указывает толщину имплантированного биоматериала. Масштабная метка: 500 мкм;

В — изменение толщины материалов с течением времени. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. * $p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным t-критерием Даннетта

Таким образом, мы показали, что при добавлении 10 % желатина в состав нетканого нановолоконного матрикса на основе ПЛА увеличивается его скорость без снижения его механических свойств во влажном состоянии. Полученные результаты могут быть применены для усовершенствования полиэфирных тканеинженерных конструкций.

Литература

1. Rim N. G., Shin C. S., Shin H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering // Biomed. Mater. 2013. Vol. 8, № 1.
2. Khorshidi S. et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications // J. Tissue Eng. Regen. Med. J Tissue Eng Regen Med. 2016. Vol. 10, № 9. P. 715–738.
3. Khadka D. B., Haynie D. T. Protein- and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials // Nanomedicine. United States. 2012. Vol. 8, № 8. P. 1242–1262.
4. Bogdanova A. et al. Acceleration of Electrospun PLA Degradation by Addition of Gelatin // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. P. 3535.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-167

ВОЗМОЖНОСТИ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ НА МОДЕЛИ БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА ЛЕГКИХ У МЫШЕЙ

ABILITIES OF NMR-SPECTROSCOPY FOR THE DIAGNOSIS OF RESPIRATORY DISEASES ON THE MODEL OF BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS IN MICE

Г. С. Воропаев, Н. А. Тимченко, А. Е. Егоров

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

G. S. Voropaev, N. A. Timchenko, A. E. Egorov

Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

✉ voropags@gmail.com

Аннотация

Диагностическая система фиброза легких основана на метаболитном анализе ЯМР-спектроскопией биожидкости бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) на модели блеомицин-индуцированного фиброза у мышей. Основная уникальность работы заключается в использовании программного пакета metabom8 на языке R для анализа и сравнения ЯМР-спектров без предварительной обработки и поиска отдельных метаболитов.

Abstract

The diagnostic system of pulmonary fibrosis is based on the metabolic analysis by NMR spectroscopy of the bronchoalveolar lavage biofluid (BAL), on the model of bleomycin-induced fibrosis in mice. The main uniqueness of the work lies in the use of the metabom8 software package in the R language for the analysis and comparison of NMR spectra without preprocessing and searching for individual metabolites.

Фиброз легких — тяжелое прогрессирующее заболевание паренхимы легких невыясненной природы с плохим прогнозом. Фиброз является осложнением при COVID-19, гриппе, бронхолегочной дисплазии и других интерстициальных заболеваний легких. В настоящее время не существует методов его лечения. Единственной мерой спасения на последних стадиях болезни является трансплантация легких. Своевременная диагностика позволяет купировать болезнь и не допустить тяжелых последствий, однако для точной постановки диагноза необходимо гистологическое исследование ткани пораженного легкого, что требует серьезного оперативного вмешательства, поэтому актуальной задачей является поиск простых и доступных методов для ранней диагностики фиброза.

Одним из перспективных подходов для ранней диагностики развития фиброза может служить метаболомика.

Метаболомика на основе ЯМР-спектроскопии является мощным инструментом для анализа метаболического профиля организма. Она позволяет детектировать до 70 метаболитов одновременно в биологических жидкостях или тканях, определять их концентрации и выявлять изменения в метаболических путях, связанные с различными физиологическими и патологическими состояниями. В данной работе для оценки развития фиброза методом ЯМР-спектроскопии по изменению метаболитного состава нами была выбрана жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛж). БАЛж получают в ходе диагностической и лечебной медицинской процедуры, предполагающей введение физиологического раствора в бронхи и легкие с последующим удалением и анализом смыва. Одной из моделей фиброза у животных является блеомицин-индуцированная модель. В этой модели использованы самки мышей линии C57BL/6 Mice. Самки более чувствительны к действию токсических веществ. В качестве агента, провоцирующего развитие фиброза, используют гликопептидный антибиотик блеомицин, который используется при лечении опухолей легких как инициатор иммунного ответа и начала процесса воспаления. Одним из его побочных эффектов является развитие фиброза легких.

Для выполнения работы нашими коллегами из Центра биологических испытаний ИБХ РАН были проведены диагностические заборы БАЛж у контрольной группы мышей и у мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом. Было сформировано 4 группы: одна контрольная здоровая группа с введением в брюшную полость физиологического раствора и три группы мышей, которым вводили блеомицин, с разной степенью поражения легких. Контроль поражения легких осуществляли по сатурации. Основной задачей работы была оценка возмож-

ности диагностировать изменения в метаболитах БАЛЖ на разных стадиях развития фиброза методом протонной ЯМР-спектроскопии. В задачи работы входило отработка способов пробоподготовки образцов БАЛЖ, получение ЯМР-спектров для групп животных, их обработка и многомерный статистический анализ, а также поиск метаболитов, присутствующих в БАЛЖ.

Основная уникальность работы заключается не в стандартном анализе метаболитов и поиске конкретного маркера болезни, а статистический анализ всего спектра полученных данных со всего образца одной мышцы и сравнение его с другими, что позволяет учесть как разницу в концентрации метаболитов, так и разницу в их составе. Впервые для анализа метаболитов БАЛЖ у мышцей с блеомицин-индуцированным фиброзом использовался программный пакет `metabom8` на языке R. С помощью него можно анализировать и проводить сравнение ЯМР-спектров без предварительной обработки и поиска отдельных метаболитов, что сокращает время работы по обработке большого пула данных с одного дня до 15 минут.

В ходе работы:

1) было показано, что ЯМР-спектроскопия БАЛЖ действительно позволяет диагностировать как развитие патологии, так и процесс выздоровления;

2) была отработана методика пробоподготовки БАЛЖ для ЯМР-анализа;

3) был освоен программный пакет `metabom8` для быстрого анализа большого пула ЯМР-данных (спектров) без предварительной обработки, который показал свою эффективность и быстроту для анализа данных БАЛЖ;

4) были определены основные метаболиты, определяемые в БАЛЖ методом ЯМР-спектроскопии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-168

**ЭФФЕКТЫ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЦА
У КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ***

**EFFECTS OF A NITRIC OXIDE DONOR ON THE ELECTRICAL ACTIVITY OF THE HEART
IN RATS WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA**

А. И. Гарипова, Р. Г. Каримова

Казанский федеральный университет

A. I. Garipova, R. G. Karimova

Kazan Federal University

✉ garipova_azaliya00@mail.ru

Аннотация

Изучена электрическая активность сердца крыс с гипергомоцистеинемией под влиянием донора оксида азота. Установлено отсутствие эффекта донора оксида азота (нитроглицерин) при гипергомоцистеинемии.

Abstract

The electrical activity of the heart of rats with hyperhomocysteinemia under the influence of a nitric oxide donor was studied. The absence of the nitric oxide donor effect (nitroglycerin) has been established with hyperhomocysteinemia.

Кардиоваскулярные заболевания занимают первое место среди причин смертности населения. В связи с этим возрастает актуальность проблемы профилактики, которая направлена на выявление и устранение факторов риска, к которым относят повышенный уровень гомоцистеина в крови. Гомоцистеин — это серо-содержащая аминокислота, которая может синтезироваться из метионина путем деметилирования. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) может быть обусловлена различными факторами и сама по себе представляет один из важных факторов развития атеросклероза, тромбоза, нейродегенеративных заболеваний и почечной недостаточности [1, 2].

Оксид азота (NO) — один из трех газомедиаторов в организме млекопитающих. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе вызывает расслабление сосудов и способствуют кардиопротекции [3]. Из литературных источников известно, что метиониновая нагрузка приводит к снижению уровня метаболитов NO в сыворотке крови [2].

Следовательно, на сегодняшний день актуален вопрос изучения механизма действия оксида азота на деятельность сердца.

Цель исследования — выявить эффекты донора NO на электрическую активность сердца у крыс с гипергомоцистеинемией.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на белых крысах линии Wistar в возрасте одного года. Во время эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария университета в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986), при температуре окружающего воздуха 22 ± 2 °C, 12-часовом синхронизированном световом режиме, с комбинированным кормом и водой в свободном доступе. Моделировали ГГЦ путем внутрижелудочного введения L-метионина в дозе 1,5 г/кг ежедневно в течение 21 дня. Дополнительно воду в поилках заменяли на 1%-й раствор метионина. Запись электрокардиограммы проводили под наркозом во втором отведении. Нитроглицерин (донор NO) вводили в дозах 0,8, 1 и 2 мг/кг с интервалом в 10 минут.

Статистический анализ проводили методами непараметрического анализа с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab, США). Использовали тесты Mann Whitney One-Sample и Wilcoxon Signed Rank Test.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-26-00167.

© А. И. Гарипова, Р. Г. Каримова, 2023

Результаты

У контрольных крыс ЧСС до введения нитроглицерина составила $295 \pm 35,76$ уд./мин. В течение первых трех минут показатель снизился до $203 \pm 26,6$ уд./мин ($p < 0,05$), к шестой минуте записи ЭКГ отмеченный эффект сохранился ($225,6 \pm 38,35$ уд./мин, $p < 0,05$), а к девятой минуте ЧСС восстановилась до исходного уровня.

У крыс с гипергомоцистеинемией отмеченных эффектов выявлено не было, ЧСС не изменялась при введении нитроглицерина.

Амплитуда зубца Р как у контрольных, так и у крыс с гипергомоцистеинемией не изменялась в течение эксперимента. Амплитуда зубца Т у контрольных крыс снижалась через 3 минуты после введения нитроглицерина ($0,376 \pm 0,07$ мВ против $0,470 \pm 0,03$ мВ, $p < 0,05$), у крыс с гипергомоцистеинемией данный эффект не проявился.

Заключение

Таким образом, у крыс с гипергомоцистеинемией отсутствуют эффекты донора оксида азота.

Литература

1. Каражанова Л. К., Жунуспекова А. С. Гипергомоцистеинемия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний (обзор литературы) // Наука и здравоохранение. 2016. № 4. С. 129–144.
2. Медведев Д. В., Звягина В. И., Урясьев О. М. и др. Метаболические изменения в митохондриях легких при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс // Биомедицинская химия. 2017. Т. 63 № 3. С. 248–254.
3. Neil S. G. et al. The role of hyperhomocysteinemia in nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated vasodilatation // Cellular and molecular biology. 2004. Vol. 50 (8). P. 911–916.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-169

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
NM-ДОМЕНА БЕЛКА M1 ВИРУСА ГРИППА А*****STUDY OF MEMBRANE INTERACTIONS OF THE NM DOMAIN
OF THE M1 PROTEIN OF INFLUENZA A VIRUS**П. К. Гифер^{1,2}, В. И. Верновская^{1,2}, О. В. Батищев¹¹*Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина, Москва*²*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*P. K. Gifer^{1,2}, V. I. Vernovskaya^{1,2}, O. V. Batishchev¹¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Moscow*²*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ gifer.pk@phystech.edu

Аннотация

Мы исследовали взаимодействие с липидными мембранами NM-домена белка M1 вируса гриппа А и структуру формируемого им белкового слоя. Была определена константа связывания данного домена с мембраной; ее значение оказалось близким таковому для полноразмерного белка M1. Это подтверждает гипотезу о том, что NM-домен определяет взаимодействие белка с мембраной, и может использоваться как мишень для поиска противовирусных препаратов.

Abstract

We studied the interaction of the NM domain of the influenza A virus M1 protein with lipid membranes and the structure of the protein layer formed by it. The binding constant of this domain to the membrane was determined; its value turned out to be close to that for the full-length M1 protein. This confirms the hypothesis that the NM domain determines the interaction of the protein with the membrane and can be used as a target for the search for antiviral drugs.

Вирус гриппа является опасным патогеном, который до сих пор является причиной высокой смертности во всем мире. Все три рода вирусов гриппа (А, В и С) принадлежат к семейству оболочечных вирусов *Orthomyxoviridae*, но только вирус гриппа А представляет основную опасность для здоровья человека. Вирус гриппа А относится к классу оболочечных вирусов, т. е. его генетический материал «спрятан» в две оболочки: белковую и липидную, последняя из которых представляет собой фрагмент плазматической мембраны клетки, захватываемой вирусом при мультипликации инфекции. На вирусной мембране данного вируса находятся три основных белка: гемагглютинин (НА), нейраминидаза (НА) и протонный канал М2. Наиболее представленным белком вируса является белок матрикса 1 (M1), который образует белковый каркас вирусной частицы непосредственно под ее липидной оболочкой, а также связывает вирусный рибонуклеопротеин. Следовательно, в полностью сформированном вирионе белок M1 выполняет важную функцию поддержания всей архитектуры вирусной оболочки [1]. Кроме того, M1, предположительно, играет ключевую роль во время сборки вириона, используя множественные белок-липидные и белок-белковые взаимодействия, и является наиболее консервативным белком среди различных штаммов вируса гриппа А [2]. Поэтому исследование его взаимодействия с липидным бислоем важно для улучшения понимания механизмов проникновения вируса в клетки живых организмов, высвобождения генома и образования новых частиц данного вируса.

Исследование полноразмерного белка M1 показало, что он представляет собой структурно-поляризованную молекулу с высокоупорядоченным NM-фрагментом и потенциально неструктурированным С-концевым доменом [3]. NM-домен участвует как во взаимодействии белка с мембраной, так и в образовании олигомеров из мономеров белка M1 в основном за счет электростатических взаимодействий, а С-концевой домен играет роль в формировании олигомеров, но уже образуя водородные связи между мономерами M1. Кроме того, С-домен взаимодействует с вирусной РНК. Предположительно, гибкость С-конца является важным свойством, которое может быть ответственным за multifunctionality всего белка. В частности, эта гибкость может позволить белку M1 структурно организовать вирусную мембрану, чтобы сохранить целостность и форму интактного вируса гриппа. С другой стороны, слабая упорядоченность С-концевого фрагмента белка M1 препятствует получению

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-54-14006.

© П. К. Гифер, В. И. Верновская, О. В. Батищев, 2023

рентгеновской структуры полноразмерного белка, что затрудняет поиск лекарственных препаратов, нацеленных на данный белок, с помощью биоинформационных методов.

Соответственно, для молекулярного моделирования и поиска лекарств с помощью молекулярного докинга подходит только NM-домен матричного белка M1, так как на данный момент известна лишь его структура [4]. В связи с этим возникают вопросы: до какой степени данный домен может моделировать полноразмерный белок и какие интерфейсы белок-липидного и белок-белкового взаимодействия задействованы на уровне отдельного домена. Таким образом, в данной работе была исследована адсорбция NM-домена белка M1 вируса гриппа А на модельных липидных мембранах, имитирующих липидных матрикс эпителиальных клеток. С помощью биоэлектрохимического метода компенсации внутримембранного поля была построена изотерма адсорбции NM-домена на бислойных липидных мембранах. Была определена константа связывания данного домена с мембраной, значение которой сравнимо с таковой для полноразмерного белка M1. Также методом атомно-силовой микроскопии высокого разрешения нами была исследована структура адсорбционного слоя белка и ее зависимость от концентрации белка в растворе и pH среды. Результаты показали, что NM-домен даже в отсутствии С-концевого домена способен моделировать взаимодействие белка с мембраной, что делает его интерфейс белок-липидного взаимодействия перспективной мишенью для поиска новых противовирусных препаратов.

Литература

1. McAuley J. L. et al. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 39.
2. Rossmann J. S., Lamb R. A. Influenza virus assembly and budding // *Virology*. 2011. Vol. 411. P. 229–236.
3. Shtykova E. V. et al. Influenza virus Matrix Protein M1 preserves its conformation with pH, changing multimerization state at the priming stage due to electrostatics // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 16793.
4. Sha B., Luo M. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1 // *Nature Structural & Molecular Biology*. 1997. Vol. 4. P. 239–244.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-170

ОБЛУЧЕНИЕ ЯИЦ *COTURNIX JAPONICA* ПРОТОНАМИ В РЕЖИМЕ FLASH ПОКАЗАЛО ЛУЧШУЮ СОХРАННОСТЬ ЗДОРОВЫХ ТКАНЕЙ И ОРГАНОГЕНЕЗА У ЭМБРИОНОВ**IRRADIATION *COTURNIX JAPONICA* EGGS WITH PROTONS IN THE FLASH MODE SHOWED BETTER PRESERVATION OF HEALTHY TISSUES AND ORGANOGENESIS IN EMBRYOS**

С. И. Глухов^{1,2}, И. А. Яковлев^{2,3}, Е. А. Кузнецова¹, В. В. Мартынова²,
Ю. К. Гаврилов², Д. А. Коконцев², С. В. Акулиничев^{2,3}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцдино

²Институт ядерных исследований РАН, Москва

³Российский научный центр хирургии им. Б. В. Петровского, Москва

S. I. Glukhov^{1,2}, I. A. Yakovlev^{2,3}, E. A. Kuznetsova¹, V. V. Martynova²,
Yu. K. Gavrilo², D. A. Kokontsev², S. V. Akulinichev^{2,3}

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

²Institute for Nuclear Research RAS, Moscow

³Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery, Moscow

✉ serglukhovmb@gmail.com

Аннотация

В работе впервые представлены данные о снижении радиотоксичности облучения яиц ускоренными протонами в пике Брэгга при подведении дозы в режиме FLASH на эмбриональное развитие амниот на модели японского перепела (*C. japonica*).

Abstract

The paper presents for the first time data on the decrease of the radiotoxicity for FLASH-mode against embryonic development of amniotes' eggs. Japanese quail (*C. Japonica*) model was used. Accelerated protons in the Bragg peak were applied to irradiated object.

Снижение радиационного поражения облучаемых клеток и тканей живых организмов за счет подведения дозы ионизирующего излучения с мощностью дозы > 40 Гр/с получило в радиобиологии название FLASH-эффекта [1]. Ряд работ уже показал, что облучение во FLASH-режиме снижает пострadiационный фиброз легких, сохраняет когнитивные функции, снижает поражения слизистой кишечника, сохраняет кроветворную функцию организма. Во многом снижение радиационного поражения при подведении дозы в режиме FLASH с точки зрения физической химии связывают с мгновенным исчерпанием растворенного в тканях кислорода, что может снижать пострadiационный окислительный стресс. Тем не менее биологические причины и особенности FLASH-эффекта в большей части пока остаются неизученными.

В то время как фотонное ионизирующее излучение выделяет максимум энергии в поверхностных слоях живого организма или его модели (водного фантома), при взаимодействии тяжелых заряженных ускоренных частиц, протонов или ионов, с живым организмом или водным фантомом максимум энергии выделяется в конце их траектории в веществе — в пике Брэгга. Это важно для онкотерапии, поскольку повышает конформность облучения при глубинном расположении опухоли.

Развитие FLASH-режима доставки терапевтической дозы ионизирующего излучения к опухоли имеет потенциал для снижения побочных эффектов облучения на здоровые ткани, что в сочетании с использованием пучков протонов дает надежду на значительно более эффективное лечение при радиотерапии опухолей.

В настоящем исследовании проведен анализ влияния режима облучения протонами в пике Брэгга и вне его во FLASH-режиме, в том числе в одноимпульсном режиме и в конвенциональном режиме с низкой мощностью дозы, на модели эмбрионального развития японского перепела (*Coturnix japonica*). Были исследованы выживаемость облученных эмбрионов, успешность завершения эмбрионального развития, сохранение когнитивных функций после облучения, наличия цитогенетических аномалий в клетках крови (микроядра, дикарионы). Было обнаружено, что облучение ускоренными протонами в пике Брэгга в режиме FLASH в значительной степени сохраняет нормальное эмбриональное развитие птенцов *C. japonica* в отличие от облучения в конвенциональном режиме подведения дозы.

Литература

1. Homsey S., Alper T. Unexpected Dose-rate Effect in the Killing of Mice by Radiation // Nature. 1966. Vol. 210 (5032). P. 212–213. DOI: 10.1038/210212a0.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-171

**ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС С МОДЕЛЬЮ ШИЗОФРЕНИИ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА**

**BEHAVIORAL RESPONSES OF RATS WITH A MODEL OF SCHIZOPHRENIA
DEPENDING ON THE STAGE OF THE ESTROUS CYCLE**

Е. А. Горохова, Р. Г. Каримова

Казанский федеральный университет

E. A. Gorokhova, R. G. Karimova

Kazan Federal University

✉ katyusha_gorokhova@bk.ru

Аннотация

В данной работе были изучены поведенческие реакции крыс с моделью шизофрении в зависимости от стадии эстрального цикла в тесте «Открытое поле». После статистической обработки была установлена зависимость между стадиями эстрального цикла и проявлениями шизофрении. Также была выявлена зависимость между поведением модельных крыс в фазы с низким и высоким уровнями эстрогена.

Abstract

In this work, we studied the behavioral responses of rats with a model of schizophrenia depending on the stage of the estrous cycle in the “Open Field” test. After statistical processing, a relationship was established between the stages of the estrous cycle and the manifestations of schizophrenia. A relationship was also found between the behavior of model rats in the phases with low and high levels of estrogen.

Шизофрения — самое распространенное гетерогенное психическое расстройство в мире, плохо поддающееся лечению современными методами. Распространенность шизофрении составляет менее 1 % в мире [1]. Заболевание влияет на раннее развитие мозга и выражается в сочетании психотических симптомов, таких как галлюцинации, бред и дезорганизация, с мотивационными и когнитивными нарушениями.

Согласно последним исследованиям, ключевое значение в патофизиологии шизофрении имеет блокировка рецептора N-метил-D-аспартата. Рецепторы N-метил-D-аспартата относятся к группе ионотропных рецепторов глутамата. Они играют важную роль в возбуждающей синаптической передаче, открывая лиганд-зависимые трансмембранные ионные каналы [2].

Известно, что антагонисты рецепторов NMDA, такие как фенциклидин, МК-801, имитируют основные симптомы шизофрении [3].

Недавние исследования свидетельствуют, что изменения, вызванные блокировкой NMDA-рецепторов, являются зависимыми от стадии эстрального цикла. На сегодняшний день исследования эстрального цикла у крыс с шизофренией предполагают изучение взаимосвязи между количеством эстрогена и тяжести проявления симптомов [2, 3].

Перед нами стояла цель — проанализировать поведенческие реакции крыс в экспериментальной модели шизофрении в зависимости от стадии эстрального цикла.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на белых крысах линии Wistar в возрасте от 3 месяцев. Во время эксперимента крысы содержались в стандартных условиях вивария университета в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986) при температуре окружающего воздуха 22 ± 2 °C, 12-часовом синхронизированном световом режиме, с комбинированным кормом и водой в свободном доступе. Моделировали шизофрению с помощью МК-801 (0,1 мг/кг), вводили ежедневно в течение 5 дней. Через месяц после моделирования ежедневно в течение 8 дней брали влажалищные мазки и определяли стадии эстрального цикла. Для изучения поведенческих реакций использовали тест «Открытое поле».

Статистический анализ проводили методами непараметрического анализа с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab, США). Использовали тесты Mann Whitney One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test.

Результаты исследований

В стадии с низким уровнем эстрогена (метаэструс, диэструс) у крыс с моделью шизофрении наблюдается повышение двигательной активности в периферической зоне, в отличие от стадий с высоким уровнем эстрогена (проэструс, эструс), $33,3 \pm 13$ против $28,9 \pm 12,4$, $p < 0,05$. Вертикальная исследовательская активность у данных крыс также увеличивается в стадии метаэструса и диэструса, а снижается в стадии проэструса и эструса, $8,9 \pm 3,4$ против $7 \pm 3,9$, $p < 0,05$. Время нахождения крыс с моделью шизофрении в периферической зоне в стадию проэструса составляет $171,6 \pm 8,4$, в стадию эструса $174 \pm 4,9$, в стадию диэструса $172 \pm 9,7$. Наименьший показатель был в стадию метаэструса $168,9 \pm 8,7$, $p < 0,05$. Среднее значение неполного груминга у модельных крыс в стадию проэструса составляет $7,2 \pm 7,7$, в стадию метаэструса $4,2 \pm 3,7$, в стадию диэструса $5 \pm 6,6$, $p < 0,05$. Наименьший показатель в стадию эструса составляет $2,4 \pm 2,5$.

Заключение

Установлена зависимость между стадиями эстрального цикла и проявлениями шизофрении. В фазы с низким уровнем эстрогена у крыс с моделью шизофрении тяжесть проявления изменений в поведении увеличивается, в то время как в фазы с высоким уровнем эстрогена симптомы менее выражены.

Литература

1. Winship I. R., Dursun S. M., Baker G. B., Balista P. A., Kandratavicius L., Maia-de-Oliveira J. P., Howland J. G. An overview of animal models related to schizophrenia // *The Canadian Journal of Psychiatry*. 2019. Vol. 64. P. 5–17.
2. Lecointe M., Vezier C., Benard M. Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice // *Dev Neurobiol*. P. 315–333.
3. Дорофейкова М. В., Кучер Е. О., Петрова Н. Н., Егоров А. Ю. Экспериментальные модели когнитивных нарушений при шизофрении // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2020. Т. 106. С. 1325–1339.
4. Локтаева А. В., Беляков В. И. Характеристика эстрального цикла у крыс и значение киспентинергической системы в его регуляции // *Вестник молодых ученых и специалистов Самарского университета*. 2016. С. 36–37.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-172

**ИЗУЧЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФУЛЛЕРЕНОЛА C_{60,70}
С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО БИОТЕСТА*****STUDY OF THE RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF FULLERENOL C_{60,70}
USING BACTERIAL LUMINESCENT BIOASSAY**А. С. Грабовой¹, О. В. Колесник², Н. С. Кудряшева^{1,2}¹Сибирский федеральный университет, Красноярск²Институт биофизики СО РАН, КрасноярскA. S. Grabovoy¹, O. V. Kolesnik², N. S. Kudryasheva^{1,2}¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk²Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

✉ lexxx1595@gmail.com

Аннотация

Были изучены радиопротекторные свойства фуллеренола C_{60,70} с использованием бактериального люминесцентного биотеста. В результате экспериментов были выявлены: активация биолюминесценции тритием, смягчение эффекта трития фуллеренолом, 20%-е повышение содержания активных форм кислорода в присутствии фуллеренола.

Abstract

Radioprotective properties of fullereneol C_{60,70} were studied using bacterial luminescent bioassay. The results of experiments showed: an activation of bioluminescence by tritium, mitigation of tritium effect by fullereneol, 20 % increase of reactive oxygen species under exposure to fullereneol.

Радиопротекторы — вещества, смягчающие воздействие радионуклидов на биологические системы. Радиопротекторное влияние веществ на биологические системы изучалось ранее [1–3]. В данной работе рассмотрен представитель группы фуллеренолов в качестве примера радиопротекторного агента. Фуллеренолы являются специфическими аллотропными формами углерода, наноразмерными полигидроксилированными водорастворимыми производными фуллеренов.

Удобной системой для скрининга радиопротекторной активности различных веществ является биолюминесцентный биотест, основанный на морских люминесцентных бактериях. Благодаря относительной дешевизне, высокой скорости проведения анализа с помощью современных люминометров (1–3 минуты) и простоте тестируемого организма данный метод позволяет проводить большое количество измерений в сопоставимых условиях и, следовательно, обеспечивать высокую достоверность статистической обработки результатов. Биолюминесцентный биотест можно использовать при изучении токсических свойств различных сред, индивидуальных веществ, включая радионуклиды, а также исследовать гормезисные модели в терминах «доза — эффект» [4].

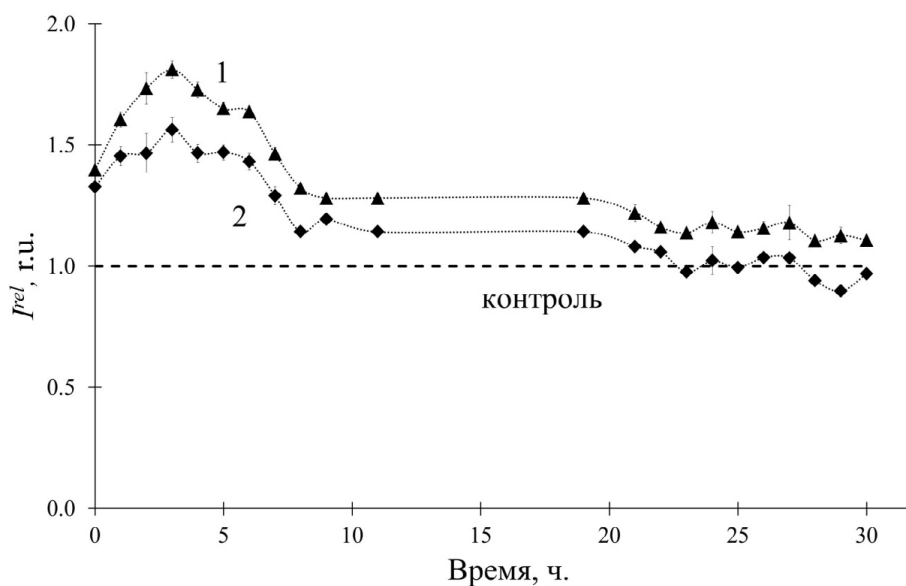
Цель работы — выявление радиопротекторной активности фуллеренола C_{60,70}O_y(OH)_x, (где x = 22–24, y = 2–4) в растворах модельного радионуклида трития с использованием биолюминесцентного бактериального биотеста на основе люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum*.

Для регистрации кинетики биолюминесцентного сигнала был использован планшетный люминометр Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, США). Лиофилизированные бактерии подвергали низкодозовому (< 0,05 Гр) воздействию трития. Кинетику биолюминесценции изучали в образцах бактерий в присутствии тритиевой воды (НТО), при этом варьировали концентрацию фуллеренола (10⁻¹⁶ – 3 · 10⁻⁵ г/л).

В результате проведения экспериментов была выявлена активация биолюминесценции тритием (см. рисунок, кривая 1), что подтверждает ранее полученные результаты [5]. Показано, что в присутствии фуллеренола (см. рисунок, кривая 2) наблюдалось смещение кинетической кривой ближе к контролю, что соответствует смягчению эффектов трития.

По результатам эксперимента было показано, что количество активных форм кислорода (АФК) выросло максимум на 20 % в присутствии фуллеренола. Данный эффект может быть объяснен стимулирующим влиянием фуллеренола на жизнедеятельность бактерий, которые интенсифицировали выработку АФК [6].

* Работа была частично поддержана РНФ (проект № 23-26-10018) и Красноярским краевым научным фондом.
© А. С. Грабовой, О. В. Колесник, Н. С. Кудряшева, 2023



Кинетика бактериальной биолюминесценции: 1 — в отсутствие фуллеренола; 2 — в присутствии фуллеренола. Удельная радиоактивность НТО — 500 МБк/л. Концентрация фуллеренола — 10^{-11} г/л

Таким образом, проведенные исследования показали, что фуллеренол $C_{60,70}O_y(OH)_x$, (где $x = 22-24$, $y = 2-4$) имеет радиопротекторные свойства: смягчение эффекта трития достигало 30–40 %. Данный эффект мы связываем с интенсификацией физиологических функций бактерий, включая биолюминесценцию и производство АФК бактериями.

Литература

1. Kudryasheva N. S., Tarasova A. S. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. Vol. 22, № 1. P. 155–167.
2. Zeman E. M. *The Biological Basis of Radiation Oncology* // *Clinical Radiation Oncology*: Elsevier. 2016. Vol. 4. P. 2–40.
3. Sachkova A. S., Kovel E. S., Churilov G. N. et al. On mechanism of antioxidant effect of fullerlenols // *Biochem. Biophys. Reports.* 2017. Vol. 9. P. 1–8.
4. Nemtseva E. V., Kudryasheva N. S. The mechanism of electronic excitation in the bacterial bioluminescent reaction // *Russ. Chem. Rev.* 2007. Vol. 76, № 1. P. 91–100.
5. Rozhko T. V., Nogovitsyna E. I., Badun G. A. et al. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells // *J. Environ. Radioact.* 2019. Vol. 208–209, № March. P. 106035.
6. Kovel E., Sachkova A., Vnukova N. et al. Antioxidant Activity and Toxicity of Fullerlenols via Bioluminescence Signaling: Role of Oxygen Substituents // *International Journal of Molecular Sciences.* 2019. Vol. 20, № 9. P. 2324.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-173

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА
РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ RAGE
ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЙ*

OBTAINING MUTANT FORMS OF THE TRANSMEMBRANE DOMAIN
OF THE RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (RAGE)
FOR STRUCTURAL NMR STUDIES

С. М. Долотова^{1,2}, Я. В. Бершадский^{1,2}, Ю. А. Загрядская¹, П. К. Кузьмичев¹,
А. В. Камынина^{1,2}, К. В. Павлов¹, И. С. Охрименко¹, Э. В. Бочаров^{1,2}

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный

²Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

S. M. Dolotova^{1,2}, Y. V. Bershatsky^{1,2}, Yu. A. Zagryadskaya¹, P. K. Kuzmichev^{1,2},
A. V. Kamynina^{1,2}, K. V. Pavlov¹, I. S. Okhrimenko¹, E. V. Bocharov^{1,2}

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ bon@nmr.ru

Аннотация

Мембранный рецептор RAGE семейства иммуноглобулинов участвует в регуляции гомеостаза нейронов и задействован в воспалительных процессах организма. Для установления молекулярного механизма передачи сигнала через мембрану рецептором RAGE мы провели структурно-динамические ЯМР-исследования рекомбинантных трансмембранных фрагментов RAGE с онкогенными мутациями G365R и G368E в мембраноподобных средах.

Abstract

The membrane receptor RAGE of immunoglobulin family is involved in regulation of neuronal homeostasis and inflammatory processes in human body. To understand the molecular mechanism of signal transduction across the membrane by RAGE, we performed structural-dynamic NMR studies of recombinant transmembrane fragments of RAGE with oncogenic mutations G365R and G368E in membrane-mimicking media.

Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) — мембранный белок I типа, относящийся к семейству иммуноглобулинов. Он состоит из рецепторной внеклеточной части, трансмембранной (ТМ) α -спирали и внутриклеточного неупорядоченного С-концевого фрагмента. Рецептор активируется большим количеством лигандов — в основном это молекулы, склонные к накоплению в очагах воспаления — интерлейкины, амилоиды, белки семейства S100. RAGE связывается с адаптерными белками, которые запускают сигнальные каскады, связанные с иммунным ответом, развитием апоптоза, клеточным ростом и другими процессами. Таким образом, RAGE является паттерн-распознающим рецептором. Недавние исследования указывают на важную роль олигомеризации рецептора в передаче сигнала внутрь клетки, однако точные молекулярные механизмы в настоящий момент плохо изучены.

RAGE экспрессируется в различных клетках во время развития организма, но во взрослом возрасте его экспрессия практически отсутствует, за исключением нейронов и альвеолоцитов. Однако экспрессия RAGE резко увеличивается в воспаленных тканях. Повышенная экспрессия рецептора ассоциирована со многими патологическими состояниями организма, например онкологическими заболеваниями и болезнью Альцгеймера. Более того, наличие мутаций в RAGE может быть причиной возникновения этих состояний. Широко исследовано влияние мутаций во внеклеточном домене на работу рецептора, но роль мутаций в ТМ-домеене остается неизученной.

В данной работе нами был разработан и оптимизирован протокол получения и очистки двух мутантных форм ТМ-фрагментов — RAGE_{tm} G365R и RAGE_{tm} G368E. В бесклеточной системе экспрессии были получены тотально ¹⁵N- и ¹⁵N,¹³C-изотопно меченые целевые белки для структурно-динамических исследований метода-

* Исследования выполнены при поддержке РФФ (проект № 23-74-00024).

© С. М. Долотова, Я. В. Бершадский, Ю. А. Загрядская, П. К. Кузьмичев, А. В. Камынина, К. В. Павлов, И. С. Охрименко, Э. В. Бочаров, 2023

ми ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Кроме того, мы накопили наборы гетероядерных спектров ЯМР для ТМ-фрагментов в мембраноподобной среде, мицеллах додецилфосфохолина, для отнесения ^1H , ^{13}C , ^{15}N -химических сдвигов и расчета пространственной структуры. Из предварительного анализа спектров ЯМР следует, что оба ТМ-фрагмента встроены в мицеллы, имеют α -спиральную конформацию и димеризуются, образуя межмолекулярные водородные связи и солевые мостики внутри мембраны. В дальнейшем на основе полученных ЯМР-данных нами будут установлены пространственные структуры высокого разрешения и описана внутримолекулярная динамика ТМ-фрагментов RAGE для установления биофизических и структурных основ молекулярного механизма передачи биохимического сигнала через плазматическую мембрану клетки рецептором RAGE в норме и при патологиях.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-174

**ПОВЫШЕНИЕ СКОРОСТИ РАЗЛОЖЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ
В МЕТОДЕ «МОКРОГО» СЖИГАНИЯ****INCREASING THE DECOMPOSITION RATE OF ORGANIC WASTE IN “WET” INCINERATION**Д. А. Жуйков¹, С. В. Трифонов²¹*Институт фундаментальной биологии и биотехнологий, Красноярск*²*Институт биофизики СО РАН, Красноярск*D. A. Zhuykov¹, S. V. Trifonov²¹*Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Krasnoyarsk*²*Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk*

✉ zdanil748@gmail.com

Аннотация

В основе метода «мокрого» сжигания экзометаболитов человека в водной среде пероксида водорода под действием электрического тока лежит тот факт, что молекула H_2O_2 представляет собой диполь, который при наложении на него переменного электромагнитного поля начинает колебаться в пространстве и активироваться. В результате проведения сжиганий экзометаболитов человека при разной частоте и форме тока было выявлено, что время сжигания при частоте электрического тока, равной 35 Гц, сокращается.

Abstract

The method of “wet” burning of human exometabolites in aqueous medium of hydrogen peroxide under the action of electric current is inspired on the fact that the H_2O_2 molecule is a dipole, which begins to oscillate in space and activate when an alternating electromagnetic field is applied to it. In the result of burning of human exometabolites at different frequency and form of current it was revealed that the time of burning, at the frequency of electric current equal to 35 Hz, is reduced.

Физико-химические методы утилизации отходов органической природы имеют целый ряд преимуществ перед биологическими методами, среди которых малое время переработки продуктов обмена, а также простота регулирования процесса. Метод «мокрого» сжигания позволяет избавиться от необходимости использования повышенной температуры и давления. Эти факты обуславливают преимущество данного метода перед такими физико-химическими методами, как суперкритическое водное окисление и процесс «Зимпро» [1, 2]. Возможности эффективного использования продуктов минерализации метаболитов методом «мокрого» сжигания представлены в многолетних исследованиях [3]. Получаемый в итоге газ и минеральный раствор не оказывают токсического действия на растения и могут быть вовлечены в круговоротные массообменные процессы [4].

Целью работы было определение влияния частоты и формы активирующего электрического тока на изменение параметров процесса минерализации таких, как время сжигания, минеральный состав продуктов.

Объектом исследования служил раствор экзометаболитов человека (кал и урина) и пероксида водорода. Были проведены сжигания данного раствора с различными параметрами частоты и формы электрического тока, а именно: а) 50 Гц, синусоида; б) 35 Гц, меандр.

Для осуществления процесса минерализации два типа метаболитов человека (плотные и жидкие отходы) смешивали друг с другом в соотношении, согласно данным [5]: 1 г плотных отходов на 10 мл урины. К полученной массе добавляли пероксид водорода (33–37 %) в соотношении 4 мл на 1 г плотных отходов, 0,5 мл на 1 мл урины. Далее через полученную смесь пропускали электрический ток с изменяемым в процессе окисления напряжением. Данный процесс можно разделить на три стадии: 1) стадия разгона, на которой происходит разогрев направленной в реактор смеси, при напряжении в электрической цепи, равном 150 В; 2) рабочая стадия, являющаяся основной во всем процессе минерализации, с напряжением 70 В; 3) стадия дожига — на ней происходит разложение оставшейся в смеси перекиси водорода при напряжении 100 В. Разделение процесса сжигания необходимо для того, чтобы избежать неконтролируемого процесса окисления и прорыва реактора.

Частота и форма электрического тока выбрана исходя из исследования [6], в котором показано, что при 35 Гц, меандр на стадии разгона наблюдается повышенное выделение газа из раствора перекиси водорода и органических отходов. При этом осуществление окисления до полного распада H_2O_2 не происходило.

По итогу проведения эксперимента было выявлено (рис. 1), что при частоте и форме электрического тока 35 Гц, меандр общее время сжигания сокращается, что является следствием сокращения времени рабочей стадии. Изменение времени сжигания на стадии дожига при данном варианте смещается к большим значениям, что, вероятно, обуславливается большим количеством перекиси водорода, оставшейся в растворе после рабочей стадии, что указывает на высокую эффективность окисления органического материала пероксидом.

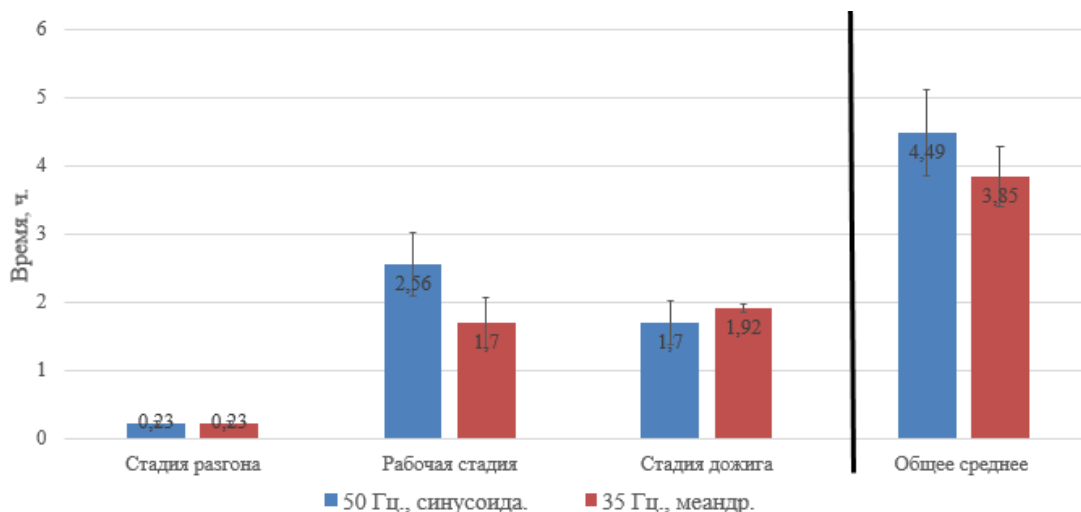


Рис. 1. Сравнение времени сжигания при разной частоте и форме тока

Результаты анализа минерального состава продуктов сжиганий представлены на рис. 2. Они свидетельствуют о сходстве минерального состава растворов и осадков, полученных при двух различных вариациях проведения экспериментов.

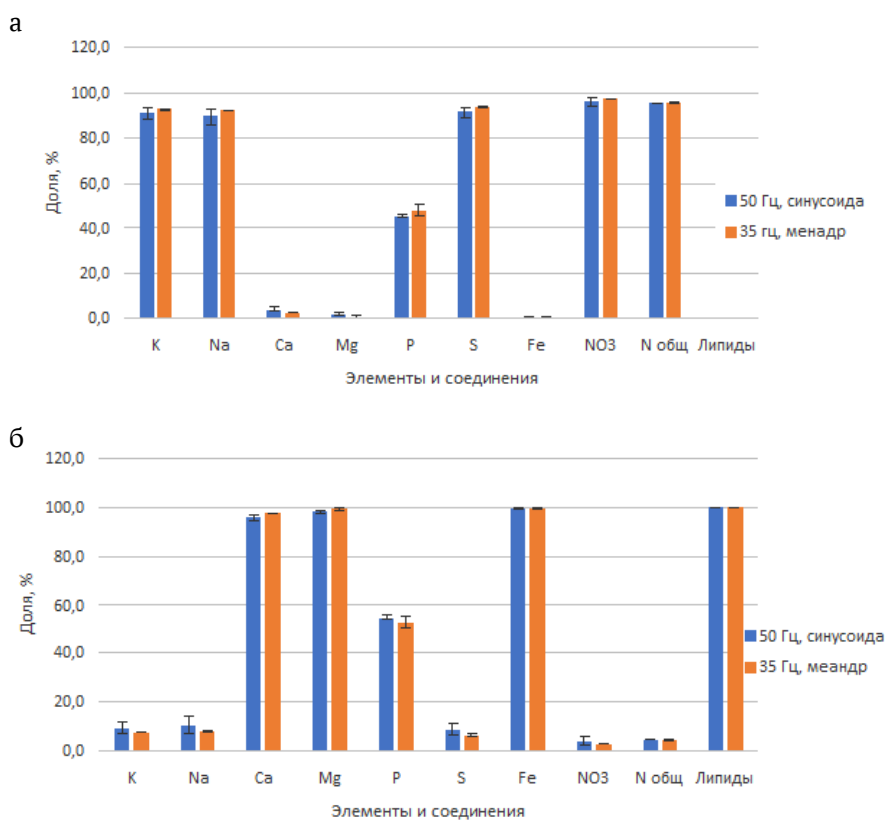


Рис. 2. Доли минеральных элементов: а – доля, вышедшая в раствор; б — доля, вышедшая в осадок

Таким образом, в ходе проделанной работы установлено, что частота и форма подаваемого электрического тока оказывает влияние на продолжительность процесса минерализации, что может быть связано с более эффективным использованием H_2O_2 .

Литература

1. Upadhye R. S., Wignarajah K., Wydeven T. // *Environ. Int.* 1993. Vol. 19 (4). P. 381–392.
2. Tsuga S., Tako Y., Endo M., Nishidate K., Fukuda S. // *Proc. of the Int. Symp. on Application of a Closed Experimental System to Modeling of ^{14}C Transfer in the Environment.* Rokkasho, Aomori, Japan. 2007. P. 119–126.
3. Tikhomirov A. A., Ushakova S. A., Manukovsky N. S., Lisovsky G. M., Kudenko Y. A., Kovalev V. S., Gribovskaya I. V., Tirrannen L. S., Zolotukhin I. G., Gros J. B., Lasseur Ch. // *Acta Astronautica.* 2003. Vol. 53. P. 249–257.
4. Tikhomirov A., Kudenko Yu., Trifonov S., Ushakova S. // *Adv. Space Res.* 2012. Vol. 49. P. 249–253.
5. С. В. Трифонов, Ю. А. Куденко, А. А. Тихомиров, В. В. Клевец. Перспективы использования «мокрого» сжигания органических отходов в перексиде водорода для замкнутых систем жизнеобеспечения. // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2014. № 22. С. 203–208.
6. Морозов Е. А. и др. Исследование влияния частоты и формы тока в растворе на распад H_2O_2 при минерализации органических отходов в замкнутых системах жизнеобеспечения // *Сибирский аэрокосмический журнал.* 2014. № 1 (53). С. 164–168.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-175

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПРОТЕОРОДОПСИНА БАКТЕРИИ, НАЙДЕННОЙ В АНТАРКТИКЕ*

CHARACTERIZATION OF PROTEORHODOPSIN OF BACTERIA FOUND IN ANTARCTICA

Ю. А. Загрядская¹, Н. А. Любайкина¹, С. Е. Храпов¹, С. М. Долотова¹,
А. А. Гавриленкова¹, Л. Е. Петровская², И. С. Охрименко¹

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный

²Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Yu. A. Zagryadskaya¹, N. A. Lyubaykina¹, S. E. Khrapov¹, S. M. Dolotova¹,
A. A. Gavrilenkova¹, L. E. Petrovskaya², I. S. Okhrimenko¹

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ Zagriadskaia.ua@mipt.ru

Аннотация

Лишь немногие из большого числа найденных с помощью метагеномики родопсинов были охарактеризованы и используются как оптогенетические инструменты или имеют биотехнологическое применение (или его потенциал). Новые необычные данные получены нами при характеристике микробного родопсина антарктической бактерии, обитающей в условиях, близких к нулевым годовым температурам, и при умеренном УФ-излучении.

Abstract

Few of the large number of metagenomically found rhodopsins have been characterized and are being used as optogenetic tools or have biotechnological applications (or potential). We obtained new unusual data while characterizing the microbial rhodopsin from an Antarctic bacterium living at the close to the zero annual temperatures and moderate UV radiation.

Протеородопсины (PR) микроорганизмов являются основным фактором, улавливающим солнечную энергию в мировом океане [1, 2]. Их влияние на экологические процессы трудно переоценить, как и необходимость их изучения. Гены PR были обнаружены в том числе и в образцах антарктического морского льда [3] (районы с умеренным УФ-излучением), и у современных строматолитов, обитающих в высокогорном Андском озере в аргентинской Пуне в районах с экстремальным УФ-облучением [4].

Однако роль PR в бактериях экстремофилах неясна. Если некоторые из этих родопсинов обладают особыми свойствами, неясно также, связано ли это с экстремальными средами обитания микроорганизмов их хозяев. Биофизические функциональные и структурные исследования PR могут не только дать ответ на этот вопрос, но и определить биотехнологический потенциал данных светочувствительных белков — ионных каналов и насосов.

Микробный родопсин из антарктической бактерии *Hymenobacter* sp., выделенной из лишайника *Usnea* sp. (о. Кинг-Джордж, Антарктида) [5], принадлежит к семейству PR и имеет уникальный мотив аминокислотных остатков RETQDK (соответствуют аминокислотным остаткам 82, 85, 89, 96, 212, 216 бактериородопсина *Halobacterium salinarum*).

По данным метеостанции Беллинсгаузен, расположенной относительно близко места сбора лишайника, средняя температура на острове колеблется от $-6,5$ °C до $1,5$ °C. На острове всего 591,3 ч безоблачной погоды в году, но присутствует повышенный фон УФ-излучения. *Hymenobacter* sp. содержит гены УФ-чувствительного эксинуклеазного комплекса UvrABC и ген эндонуклеазы УФ-повреждения ДНК, участвующие в восстановлении ДНК после повреждения ионизирующим излучением [5].

Среди всех свойств родопсина *Hymenobacter* sp. обращает на себя внимание невероятно долгий фотоцикл. Спектр родопсина существенно меняется при освещении — происходит переход максимума поглощения от 515 до 409 нм при нейтральных значениях pH. Максимум при 409 нм соответствует М-состоянию фотоцикла с депротонированным основанием Шиффа. Через ~ 5 мин в темноте родопсин возвращается в основное состояние, таким образом, продолжительность фотоцикла составляет несколько минут. Такая медленная кинетика позволяет предположить, что родопсин является сенсорным. За геном родопсина в геноме бактерии-хозяина следуют гены

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-14-00160.

TonB и gmhA. Предполагается, что TonB вместе с PR участвует в светозависимом поглощении витамина B12 у *Flavobacteria* [6]. Родопсин *Hymenobacter* sp. является перспективным объектом для время-разрешенных исследований методами рентгеновской кристаллографии, а высокая светочувствительность родопсина при устойчивости к УФ дает родопсину биотехнологические перспективы использования.

Литература

1. Béja O. et al. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea // *Science*. 2000. Vol. 289, № 5486. P. 1902–1906.
2. Gómez-Consarnau L. et al. Microbial rhodopsins are major contributors to the solar energy captured in the sea // *Science advances*. 2019. Vol. 5, № 8. P. eaaw8855.
3. Koh E. Y. et al. Proteorhodopsin-bearing bacteria in Antarctic sea ice // *Applied and environmental microbiology*. 2010. Vol. 76, № 17. P. 5918–5925.
4. Albarracín V. H. et al. Functional green-tuned proteorhodopsin from modern stromatolites // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 5. P. e0154962.
5. Oh T. J. et al. Complete genome sequence of *Hymenobacter* sp. strain PAMC26554, an ionizing radiation-resistant bacterium isolated from an Antarctic lichen // *Journal of Biotechnology*. 2016. Vol. 227. P. 19–20.
6. Gómez-Consarnau L. et al. Proteorhodopsin light-enhanced growth linked to vitamin-B1 acquisition in marine *Flavobacteria* // *The ISME Journal*. 2016. Vol. 10, № 5. P. 1102–1112.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-176

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ АНИДУЛАФУНГИНА ФОРМИРОВАТЬ ПОРЫ
В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА *****RESEARCH OF THE ABILITY OF ANIDULAFUNGIN TO FORM PORES
IN MODEL MEMBRANES OF VARIOUS COMPOSITION**

А. А. Захарова, С. С. Ефимова, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

A. A. Zakharova, S. S. Efimova, O. S. Ostroumova

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ zaza2187@bk.ru

Аннотация

Скрининг большого числа липидных молекул впервые позволил обнаружить способность анидулафунгина формировать ион-проводящие поры в модельных мембранах, образованных липидами, имеющими форму инвертированного конуса, что может указывать на существенный вклад изменения распределения латерального давления в бислое в регуляции мембранной активности антибиотика.

Abstract

It was for the first time showed that anidulafungin is able to form ion-permeable pores in model membranes formed by inverted cone-shaped lipids. It might indicate a significant contribution of changes in the distribution of the lateral pressure in the bilayer in the regulation of the membrane activity of the antibiotic.

На сегодняшний день в клинической практике противогрибковыми препаратами выбора являются два основных класса лекарственных агентов: азолы, подавляющие синтез эргостерина, и полиены, способные связываться с этими компонентами липидного матрикса, образуя ион-проводящие поры, что приводит к дестабилизации мембраны и разрушению грибковой клетки [1, 2]. Однако высокая токсичность полиенов и развитие резистентности к препаратам класса азолов приводят к необходимости поиска новых противогрибковых препаратов с уникальными механизмами действия.

Одной из перспективных групп соединений с широким спектром противогрибковой активности считаются эхинокандины, представляющие собой группу вторичных микробных метаболитов, молекулы которых состоят из гидрофильного циклического пептидного ядра и липофильного углеводородного остатка. Эхинокандины являются препаратами выбора для лечения микозов, вызванных *C. albicans* и *glabrata*, относятся к новейшим противогрибковым агентам. Считается, что основным механизмом действия этой группы антибиотиков является ингибирование синтетического комплекса ферментов клеточной стенки 1,3- β -глюкан-синтазы, что приводит к нарушению целостности грибковой клетки и ее гибели. Однако некоторыми учеными было показано, что положение и конформация N-ацильных боковых цепей в составе молекул эхинокандинов имеют решающее значение для противогрибковой активности эхинокандинов, а также могут индуцировать гемолиз клеток млекопитающих, что подразумевает непосредственное взаимодействие этих соединений с липидной мембраной [3–6].

В связи с этим, **целью** работы являлось установление роли липидного микроокружения в способности анидулафунгина проявлять мембранную активность.

Для создания адекватных моделей мембран клеток-мишеней использованы модельные липидные бислои, включающие различные фосфолипиды, характерные для мембран грибковых клеток. Для решения поставленных задач применен электрофизиологический метод регистрации токов, протекающих через модифицированные анидулофунгином плоские липидные бислои, при фиксации трансмембранного напряжения.

Установлено, что анидулофунгин способен формировать ион-проводящие поры, характеризующиеся различными уровнями проводимости, при введении в раствор, омывающий бислой из глицеринмоноолеат, до концентрации 20 мкМ. Результаты анализа макроскопического трансмембранного тока, индуцированного открытием большого числа липопептидных пор, показывают, что при вышеуказанной концентрации максимальная величина проводимости мембраны может достигать 5000 пСм при трансмембранном напряжении 50 мВ. При за-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-74-10023.

© А. А. Захарова, С. С. Ефимова, О. С. Остроумова, 2023

мене глицеринмоноолеата на диолеилфосфохолин исследуемая величина значительно снижается и составляет около 200 пСм при той же концентрации эхинокандина. Анализ вероятности наблюдения флуктуаций проводимости мембраны из глицеринмоноолеата или диолеилфосфохолина, индуцированной эхинокандином, составляет примерно 70 и 30 % соответственно. В случае диолеилфосфоэтаноламина увеличения проводимости мембраны, обусловленной встраиванием в нее анидулофунгина, не обнаружено до концентрации 20 мкМ.

Сопоставление данных влияния анидулофунгина на модельные мембраны из глицеринмоноолеата, диолеилфосфохолина или диолеилфосфоэтаноламина и геометрических характеристик молекул липидов, из которых сформированы бислои, позволило сделать предположение о возможности регуляции мембранного действия анидулофунгина перераспределением латерального давления в бислое.

Литература

1. Berg D., Plempel M., Büchel K.H. et al. Sterol biosynthesis inhibitors. Secondary effects and enhanced in vivo efficacy // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988. Vol. 544. P. 338–347.
2. De Kruijff B. et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1974.
3. Wiederhold N.P., Lewis R.E. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2003.
4. Odds F.C., Brown A.J., Gow N.A. Antifungal agents: mechanisms of action // *Trends in microbiology*. 2003. Vol. 11 (6). P. 272–279.
5. Abruzzo G.K., Flattery A.M., Gill C.J. et al. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997. Vol. 41 (11). P. 2333–2338.
6. Mikamo H. et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of a new injectable carbapenem, S-4661, against gynaecological pathogens // *J. Antimicrob. Chemother.* 2000.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-177

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ РАСТВОРОВ СЕЛЕН-СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ,
ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ И СИНТЕЗА ЭЛЕМЕНТАРНОГО СЕЛЕНА**

**ASSESSMENT OF THE BACTERIAL BIOLUMINESCENCE POTENTIAL FOR MONITORING
THE SELENIUM COMPOUND SOLUTIONS TOXICITY, DETOXIFICATION AND ELEMENTARY
SELENIUM SYNTHESIS**

А. В. Зеньков¹, Е. С. Сушко^{1,2}, А. Б. Сарангова¹, Н. С. Кудряшева^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Институт биофизики СО РАН, Красноярск

A. V. Zenkov¹, E. S. Sushko^{1,2}, A. B. Sarangova¹, N. S. Kudryasheva^{1,2}

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk

²Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

✉ andrei.zenkow222@gmail.com

Аннотация

Изучено действие селенита натрия (Na_2SeO_3) как селено-содержащего соединения на бактериальную биолюминесценцию и способность *Photobacterium phosphoreum* к биотрансформации селеновых оксианионов до элементарного селена. Показано, что люминесцентные бактерии — перспективный инструмент для оценки токсичности, детоксикации соединений селена в водных растворах и синтеза элементарного селена.

Abstract

Impact of sodium selenite (Na_2SeO_3) (as a selenium compound) on bacterial bioluminescence and *Photobacterium phosphoreum* selenium oxyanions biotransformation to elementary selenium was investigated. Luminous bacteria were demonstrated to be a prospective tool for selenium compounds' toxicity monitoring, detoxification of water solutions and elementary selenium synthesis.

Селен — это важный микроэлемент, участвующий в метаболических процессах, в частности, в поддержании постоянного уровня активных форм кислорода (АФК). Избыток или недостаток селена приводят к нарушениям клеточного метаболизма. Токсичность селен-содержащих соединений обусловлена их воздействием на метаболические пути и проявляется в инактивации металлосодержащих оксидаз и повреждении молекул ДНК. Актуальна проблема неравномерного распределения селена: некоторые районы Земли загрязнены или обеднены селеном, в результате чего у жителей данных территорий наблюдается дисбаланс селена, приводящий к различным патологиям [1, 2].

Биореакторы с селенит-восстанавливающими микроорганизмами — потенциальное решение проблем очистки сточных вод, загрязненных селен-содержащими веществами, и получения элементарного селена для восполнения его дефицита путем добавления в почву, воду или непосредственно в продукты питания. Для повышения эффективности биореакторов требуется оптимизация условий культивирования на основе множества характеристик растворов, таких как pH и соленость. Получаемые в биореакторах наночастицы селена с биополимерной оболочкой и дополнительными модификациями перспективны для антимикробной и противоопухолевой терапии благодаря биодоступности и увеличению внутриклеточной концентрации АФК с последующей гибелью клеток [2, 3].

Биотесты, основанные на бактериальной биолюминесценции — удобный инструмент для оценки токсичности различных веществ, так как они характеризуются экспрессностью, чувствительностью, а также интегральностью воздействия индивидуальных токсикантов на одноклеточный организм. Данный биотест перспективен для оценки токсичности селен-содержащих водных растворов [2, 4]. С другой стороны, в настоящее время интенсивно ведутся исследования по внутриклеточному синтезу элементарного селена некоторыми бактериями в водных средах, содержащих водорастворимые соединения селена. Существует возможность детоксикации растворов соединений селена с помощью люминесцентных бактерий в результате накопления этих соединений в клетках с последующим внутриклеточным восстановлением до наночастиц элементарного селена. Биолюминесценция может быть применена для создания систем контроля за токсическими показателями

среды, что важно для поддержания работы селено-восстанавливающих реакторов [2, 4]. Кроме того, бактериальная биолюминесценция может быть инструментом для оценки воздействия новых материалов на основе селена на клетки патогенных бактерий и опухолевые клетки, так как интенсивность свечения бактерий связана с содержанием АФК [3, 5].

Цель работы — продемонстрировать возможность использования люминесцентных бактерий *Photobacterium phosphoreum* для оценки токсичности селенита натрия (Na_2SeO_3) и детоксикации его растворов путем внутриклеточного восстановления селеновых оксианионов до элементарного селена.

Были определены зависимости интенсивности биолюминесценции *Ph. phosphoreum* от концентрации Na_2SeO_3 при различных временах его воздействия (рис. 1). Установлено, что диапазон низких концентраций селенита (10^{-5} – 10^{-1} М) характеризуется активацией биолюминесценции, а при больших концентрациях наблюдается ингибирование свечения. Минимальная эффективная концентрация селенита натрия ЕС-50, подавляющая интенсивность биолюминесценции на 50 % и характеризующая токсичность этого вещества, оказалась равной 10^{-4} М. Предположительно, механизм усиления биолюминесценции при действии Na_2SeO_3 связан с повышением уровня АФК, вызванного процессами восстановления оксианиона селена до элементарного селена [5].

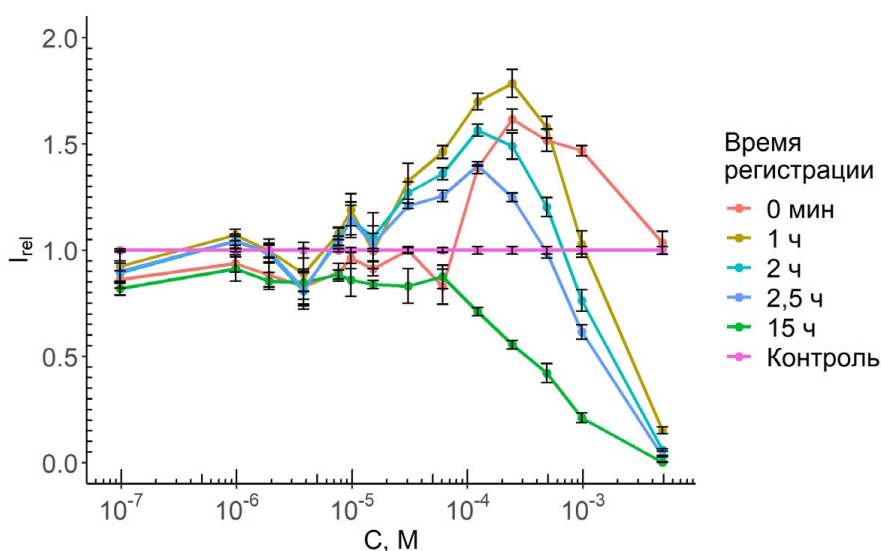
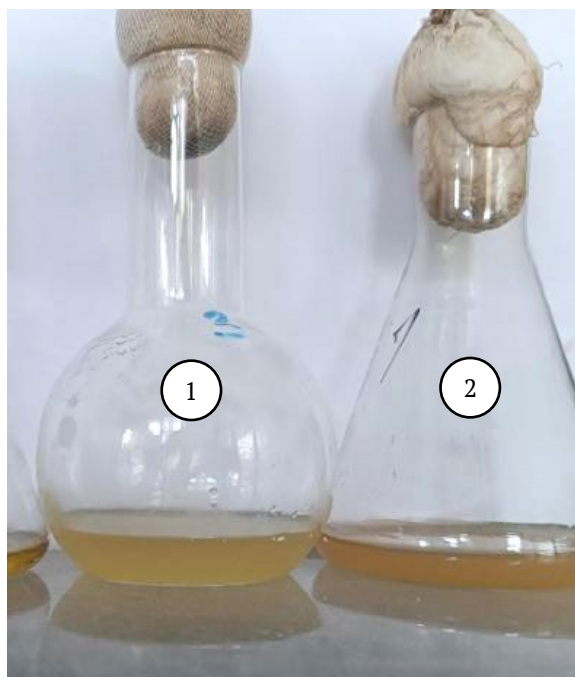


Рис. 1. Зависимость интенсивности биолюминесценции *Photobacterium phosphoreum* I^{rel} от концентрации Na_2SeO_3 при различных временах регистрации свечения



Для оценки биотрансформации оксианионов до элементарного селена была выращена бактериальная культура *Ph. phosphoreum* в присутствии Na_2SeO_3 , 10^{-5} М в течение 7 дней (168 ч). Обнаружено изменение цвета бактериальной суспензии без заметной задержки роста бактерий (рис. 2), что свидетельствует о частичном восстановлении Na_2SeO_3 . При этом при концентрациях 2×10^{-3} М, 5×10^{-5} М и 10^{-2} М наблюдали уменьшение скорости роста бактерий в течение 18 ч (время выхода контрольной культуры на стационарную фазу) [6].

Таким образом, бактериальная биолюминесценция может рассматриваться как удобная модель для изучения воздействия новых селен-содержащих соединений на клетки. Люминесцентные бактерии могут яв-

Рис. 2. Изменение окраски бактериальной суспензии после 7 дней культивирования *Ph. phosphoreum* в 10^{-5} М Na_2SeO_3 . 1 — суспензия контрольной бактериальной культуры *Ph. phosphoreum*, 2 — бактериальная культура с частично восстановленным Na_2SeO_3

ляться инструментом для одновременной оценки токсичности и контроля за восстановлением селеновых оксианионов, для детоксикации растворов селен-содержащих соединений и биогенного синтеза элементарного селена.

Литература

1. Полубояринов П. А. и др. Метаболизм и механизм токсичности селеносодержащих препаратов, используемых для коррекции дефицита микроэлемента селена // Тонкие химические технологии. 2019. Т. 14, № 1. С. 5–24. DOI: 10.32362/2410-6593-2019-14-1-5-24.
2. Werkneh A., Gebretsadik G., Gebru S. Review on environmental selenium: Occurrence, public health implications and biological treatment strategies // Environmental Challenges. 2023. Vol. 11. P. 100698. DOI: 10.1016/j.envc.2023.100698.
3. Satarzadeh N., Dousari S.D., Amirheidari B. et al. An insight into biofabrication of selenium nanostructures and their biomedical application // 3 Biotech. 2023. Vol. 13 (3). P. 79. DOI: 10.1007/s13205-023-03476-4.
4. Физика и химия биолюминесценции: учеб. пособие. 2-е изд. / В. С. Бондарь, Е. С. Высоцкий, Е. Н. Есимбекова и др. Красноярск: Сиб. фед. ун-т, 2015. 268 с.
5. Rozhko T. V. et al. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells // Journal of Environmental Radioactivity. 2019. Vol. 208–209. P. 106035. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106035>.
6. Tugarova A. V., Vetchinkina E. P., Loshchinina E. A. et al. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles // Microb. Ecol. 2014. Vol. 68 (3). P. 495–503. DOI: 10.1007/s00248-014-0429-y.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-178

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ В СТРУКТУРЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК,
ВЫЗВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ***

**DETECTION OF DAMAGE IN THE STRUCTURE OF THE DNA MOLECULE,
CAUSED BY VARIOUS TYPES OF IONIZING RADIATION**

Д. Н. Иванова¹, О. М. Котб^{1,2}, Д. С. Брожник³, В. Н. Вербенко³, Е. П. Гулевич³, В. Ф. Ежов^{1,3},
Д. Л. Карлин³, И. Ф. Мурзакова¹, Ф. А. Пак³, С. В. Пастон¹, Э. В. Фомин³, А. И. Халиков³

¹Санкт-Петербургский государственный университет

²Университет Загазига, Египет

³Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Гатчина

D. N. Ivanova¹, O. M. Kotb^{1,2}, D. S. Brozhik³, V. N. Verbenko³, E. P. Gulevich³, V. F. Ezhov^{1,3},
D. L. Karlin³, I. F. Murzakova¹, F. A. Pak³, S. V. Paston¹, E. V. Fomin³, A. I. Khalikov³

¹Saint Petersburg State University

²Zagazig University, Egypt

³Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina

✉ st076983@student.spbu.ru

Аннотация

В настоящей работе изучаются изменения в структуре ДНК под действием различных ионизирующих излучений: протонов с энергией 1 ГэВ, гамма-излучения ⁶⁰Со с энергией квантов 1,17 МэВ и 1,33 МэВ и мягкого рентгеновского излучения со средней энергией квантов 60кэВ. Получены дозовые зависимости температуры плавления ДНК и радиационно-химического выхода разрушения азотистых оснований при дозах излучений 0–100 Гр.

Abstract

In the present work we study changes in the structure of DNA under the action of various ionizing radiations: protons with an energy of 1 GeV, ⁶⁰Co gamma radiation with photons energies of 1.17 MeV and 1.33 MeV, and soft X-ray radiation with an average photon energy of 60 keV. The dose dependences of the DNA melting temperature and the radiation-chemical yield of destruction of nitrogenous bases were obtained at radiation doses of 0–100 Gy.

Поражения ДНК лежат в основе радиационной гибели клетки, мутаций и злокачественного перерождения, а в случае воздействия на половые клетки и в основе генетических последствий облучения родителей для потомства. В результате прямой ионизации самой молекулы ДНК и ее атаки активными продуктами радиолиза происходит химическая модификация макромолекулы. К наиболее вероятным радиационным повреждениям ДНК относятся разрушение и отрыв азотистых оснований (а. о.), одно- и двунитевые разрывы, нарушения вторичной структуры [1]. В настоящей работе изучаются изменения в структуре ДНК под действием различных ионизирующих излучений: протонов с энергией 1 ГэВ, гамма-излучения ⁶⁰Со с энергией квантов 1,17 МэВ и 1,33 МэВ и мягкого рентгеновского излучения со средней энергией квантов 60кэВ.

Для определения радиационно-химического выхода разрушения а. о. (G) был применен метод Спирина определения концентрации хромофоров после полного разрушения вторичной структуры ДНК путем гидролиза [2]. Нарушения первичной и вторичной структуры ДНК исследовали методом спектрофотометрического плавления ДНК. Растворы ДНК нагревали от 20 °С до 98 °С со скоростью 1°/мин в термостатируемой кварцевой кювете, измеряя оптическую плотность раствора в максимуме спектра поглощения ДНК при $\lambda = 260$ нм (D_{260}). Полученные зависимости $D_{260} = f(T)$ и $\frac{dD_{260}}{dT} = \varphi(T)$ представляют собой кривые плавления ДНК, их форма существенно

зависит от состояния первичной и вторичной структуры ДНК в исходном растворе [3].

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-10105.

Часть исследований проведена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

© Д. Н. Иванова, О. М. Котб, Д. С. Брожник, В. Н. Вербенко, Е. П. Гулевич, В. Ф. Ежов, Д. Л. Карлин, И. Ф. Мурзакова, Ф. А. Пак, С. В. Пастон, Э. В. Фомин, А. И. Халиков, 2023

В работе были исследованы растворы ДНК с концентрацией низкомолекулярного электролита 5 мМ и 0,15 М NaCl. В растворе 0,15 М NaCl, который соответствует физиологическим условиям, экранировка фосфатных групп ДНК значительно эффективнее, их электростатическое расталкивание существенно меньше, поэтому объем клубка ДНК в этих условиях меньше и вторичная структура, двойная спираль, более стабильна. Поскольку размер мишени и структура нативной ДНК являются важными факторами, определяющим радиационный эффект, в данной работе были исследованы растворы ДНК с указанными концентрациями ионов Na⁺.

Во всех исследованных растворах облучение вызывает снижение температуры плавления, что является следствием дестабилизации вторичной структуры ДНК. Также на дифференциальных кривых плавления происходит уширение перехода спираль — клубок с ростом дозы облучения. Это объясняется тем, что облученная ДНК имеет более гетерогенную вторичную структуру, чем необлученная. В растворах 0,15 М NaCl температура плавления T_m необлученной и облученной ДНК существенно выше, чем в растворах 5 мМ NaCl, — как и ожидалось, мы наблюдаем эффект стабилизации вторичной структуры ДНК из-за экранировки фосфатных групп ионами Na⁺. Были получены дозовые зависимости T_m и G при дозах протонного, рентгеновского и гамма-излучений 0–100 Гр. Показано, что наименьшее влияние на T_m ДНК оказывает мягкое рентгеновское излучение, наибольшее повреждающее действие оказывают высокоэнергетичные γ -кванты, протонное же излучение по эффективности занимает промежуточное положение. Однако наибольшее разрушение а. о. ДНК достигается при протонном облучении, а эффективность гамма- и рентгеновского излучения по этому параметру совпадает в пределах погрешности. Эксперимент показал, что рентгеновское облучение сухого образца практически не повлияло на вторичную структуру ДНК, в отличие от ДНК, облученной той же дозой в растворе.

Таким образом, можно заключить, что при рентгеновском облучении основной вклад в повреждения ДНК вносит косвенное действие радиации. Концентрация ДНК в облучаемом растворе (концентрация мишеней) влияет на количество повреждений: с уменьшением концентрации ДНК радиационно-химический выход а. о. снижается.

Литература

1. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит, 2004. 442 с.
2. Tankovskaia S. A., Kotb O. M., Dommès O. A., Paston S. V. Application of spectral methods for studying DNA damage induced by gamma-radiation // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2018. Vol. 200. P. 85–92.
3. Веденов А. А., Дыхне А. М., Франк-Каменецкий М. Д. Переход спираль-клубок в ДНК // УФН. 1971. Т. 105, вып. 3. С. 479–519.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-179

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ТКАНЕЙ

USING OF LONG-TERM LUMINESCENCE OF MOLECULAR PROBES TO ASSESS THE MALIGNANCY OF TISSUES

А. Т. Ишемгулов¹, С. Н. Летута¹, М. А. Сенчукова²¹Оренбургский государственный университет²Оренбургский государственный медицинский университетА. Т. Ishemgulov¹, S. N. Letuta¹, M. A. Senchukova²¹Orenburg State University²Orenburg State Medical University

✉ azamat.ischemgulov@yandex.ru

Аннотация

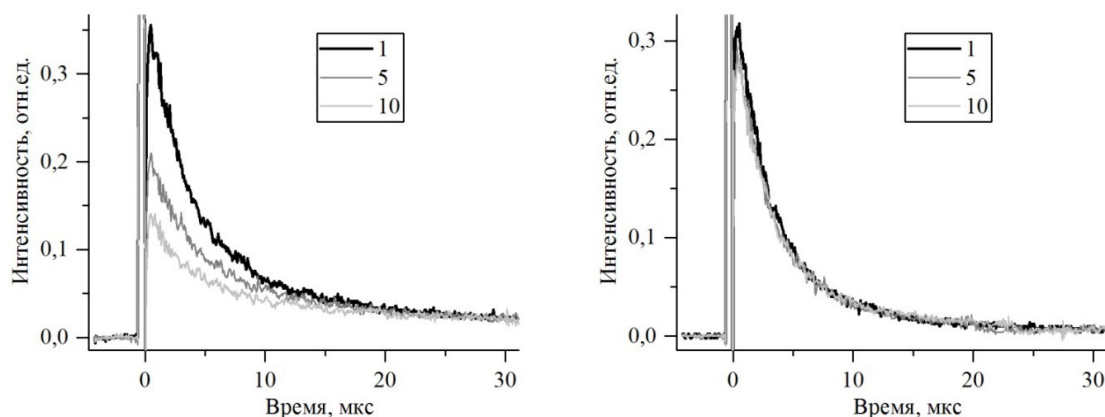
Исследована кинетика длительной люминесценции ксантеновых красителей (эозина, эритрозина) в тканях молочной железы *in vitro*. По результатам анализа около 180 образцов обнаружены статистически значимые различия в характере замедленной люминесценции между злокачественными и нормальными тканями. Обнаруженные различия, предположительно, связаны с особенностями накопления и расходования кислорода в тканях.

Abstract

The kinetics of long-term luminescence of xanthene dyes (eosin, erythrosin) in mammary gland tissues *in vitro* has been studied. Analysis of about 180 samples revealed statistically significant differences in the delayed luminescence between malignant and normal tissues. The differences found are presumably related to the peculiarities of the accumulation and consumption of oxygen in the tissues.

Экспресс-оценка границ злокачественной ткани остается актуальной проблемой онкохирургии. Перспективным способом решения этой проблемы является применение люминесцентных методов. В настоящей работе исследуется кинетика длительной люминесценции ксантеновых красителей (эозина, эритрозина) в тканях молочной железы *in vitro* с целью обнаружения различий в характере замедленной люминесценции между злокачественными и нормальными тканями.

В работе использовались образцы молочной железы, полученные от пациенток онкологического диспансера и окрашенные раствором красителя концентрации 10^{-5} моль/л. Все исследования проводились с соблюдением надлежащих требований этики и деонтологии. Источником возбуждения служил импульсный YAG-лазер (532 нм),



Кинетика затухания замедленной флуоресценции эритрозина в тканях злокачественной опухоли молочной железы (слева) и в прилегающем лимфоузле (справа) для 1-го, 5-го и 10-го возбуждающих импульсов, следовавших с частотой 10 Гц

свечение регистрировалось с помощью ФЭУ-84 через монохроматор МДР-41. В ходе строб-облучения для некоторых образцов обнаружено обратимое изменение формы кинетических кривых (интенсивности и продолжительности свечения), если частота возбуждающих импульсов превышала 5–10 Гц. В частности, в полосе замедленной флуоресценции (560–570 нм) наблюдалось тушение начального участка кинетической кривой (см. рисунок).

Аналогичные данные ранее были получены для лабораторных мышей [1, 2]. Так, было показано, что замедленная флуоресценция (ЗФ) ксантовых красителей в тканях состоит из свечения двух типов: Е-типа (термически обусловленная) и бимолекулярного типа (обусловлена реакцией молекул триплет-возбужденного красителя и синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, далее СК-ЗФ). Тушение СК-ЗФ, сопровождающееся увеличением продолжительности и интенсивности фосфоресценции и ЗФ Е-типа, указывает на постепенное снижение концентрации кислорода в образце в ходе облучения (видимо, за счет окислительных реакций с участием $^1\text{O}_2$). То есть ткани отличаются либо по количеству молекулярного кислорода в них, либо по характеру образования и/или потребления синглетного кислорода $^1\text{O}_2$.

По результатам анализа 180 образцов обнаружено статистически значимое различие между злокачественными и нормальными тканями с помощью t-критерия Стьюдента с уровнем значимости 0,05 для указанных величин. Полученные результаты могут найти применение в биомедицинской диагностике.

Литература

1. Letuta S.N. et al. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2016. Vol. 163. P. 231–236. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036.
2. Letuta S.N., Ishemgulov A.T., Letuta U.G., Pashkevich S.N. Continuous in vivo monitoring of the oxygen concentration in tissues // Biophysics. 2018. Vol. 63 (5). P. 798–804. DOI: 10.1134/S0006350918050160.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-180

**УПРАВЛЕНИЕ ФОРМОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОСТЬЮ КОМПЛЕКСОВ РНК,
ОБРАЗОВАННЫХ ПАРОЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*****CONTROLLING THE SHAPE AND MOLECULARITY OF RNA COMPLEXES
FORMED BY A PAIR OF OLIGONUCLEOTIDES**

М. А. Канарская, А. А. Ломзов

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

M. A. Kanarskaya, A. A. Lomzov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ makanarskaya@gmail.com

Аннотация

Вторичная и третичная структуры нуклеиновых кислот во многом определяют их биологические функции. Исследована структура РНК-комплексов, образованная парой олигонуклеотидов. Установлены тип и размер таких комплексов в зависимости от длины линкеров, соединяющих дуплексные участки. Исследовано взаимодействие комплексов с РНК-опенером и стоппером с целью изучения возможности направленного регулирования формы и молекулярности комплексов. Показана возможность линеаризации циклических комплексов и их обратной циклизации.

Abstract

The nucleic acids secondary and tertiary structures largely determine their biological functions. The structure of RNA complexes formed by oligonucleotides pair has been studied. The depending of such complexes type and size on the length of the linker connecting duplex sections has been determined. The interaction of complexes with an opener and a stopper has been investigated, aimed at investigating the possibility of directional regulation of the shape and molecular structure of complexes. The possibility of cyclic complexes linearization and their reverse cyclization has been shown.

Ранее в ИХБФМ СО РАН были детально исследованы самоограниченные комплексы, сформированные парой олигодезоксирибонуклеотидов, которые имеют два попарно-комплементарных участка, между которыми в каждой последовательности введен гибкий линкер [1]. Опенер — короткая последовательность НК, комплементарная одному из фрагментов одной из цепей самоограниченного комплекса. В результате взаимодействия такого комплекса и опенера комплекс может разворачиваться, образуя линейную незамкнутую форму. Стоппер — короткая последовательность НК, комплементарная опенеру. При добавлении стоппера к раскрытому опенером комплексу последний должен вновь замкнуться в комплекс такой же молекулярности или более низкой.

Целью данной работы является исследование структуры РНК-комплексов, образованных парой олигонуклеотидов, и возможности контроля формы и размера комплексов РНК за счет взаимодействия с РНК-опенером и РНК-стоппером.

Объектом исследования являлись РНК-олигонуклеотиды, состоящие из 10 звеньев, соединенных линкерами разной длины (0–15 нуклеотидов). В качестве опенера и стоппера были взяты последовательности с дополнительным участком из 5 и 10 нуклеотидов. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала исследована термостабильность модельных комплексов. Показано, что стабильность комплексов РНК, образованных парой олигонуклеотидов с разной длиной линкеров, варьируется в диапазоне 50–60 °С. Для анализа структуры и молекулярности комплексов использован метод гель-электрофореза в неденатурирующих условиях. Установлена возможность формирования конкатамерных и самоограниченных комплексов. Молекулярность самоограниченных комплексов определяли путем анализа из взаимодействия с опенером, содержащим нависание размером 5 нуклеотидов, методом гель-электрофореза. Исследование взаимодействия самоограниченного комплекса с опенером и стоппером, показало, что открытые опенером комплексы не сворачиваются обратно при взаимодействии со стоппером, что противоречит предположению. Мы предположили, что выбранные опенер

* Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 20-04-0719 и в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7.

и стоппер не способны взаимодействовать ввиду термодинамических причин. Поэтому были выбраны новые удлиненные последовательности, формирование которых должно протекать более эффективно, что было подтверждено методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Последующий электрофоретический анализ показал, что при добавлении опенера бимолекулярный комплекс раскрывается в линейную форму, а при добавлении стоппера комплекс возвращается в исходное состояние. При аналогичном взаимодействии с более высокомолекулярными комплексами установлено, что при добавлении стоппера к линейной структуре часть комплексов возвращается в исходное положение, часть сворачивается в структуры с большей подвижностью, что соответствует комплексам с меньшей молекулярностью. Таким образом, было показано, что добавление определенных последовательностей НК к самоограниченным комплексам позволяет направленно изменять их молекулярность и геометрию.

Литература

1. Zamoskovtseva A.A., Golyshev V.M., Kizilova V.A. et al. Pairing nanoarchitectonics of oligodeoxyribonucleotides with complex diversity: concatemers and self-limited complexes // RSC Advances. 2022. Vol. 12, № 11. P. 6416–6431.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-181

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДНК- И мРНК-ВАКЦИН^{*}

PHYSICAL METHODS FOR THE DELIVERY OF EXPERIMENTAL DNA- AND MRNA-VACCINES

Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина,
А. М. Задорожный, Е. В. Тигеева, В. А. Яковлев, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

D. N. Kisakov, L. A. Kisakova, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina,
A. M. Zadorozhny, E. V. Tigeeva, V. A. Yakovlev, A. P. Rudometov, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ def_2003@mail.ru

Аннотация

В работе исследованы иммуногенные и протективные свойства ДНК- и мРНК-вакцин на мышах линии BALB/c, иммунизированных с помощью физических методов введения (электропорация и струйная инъекция). Показано, что используемые методы доставки индуцируют формирование высокого уровня гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, обеспечивая защитный иммунитет против вируса SARS-CoV-2.

Abstract

The immunogenic and protective properties of DNA and mRNA vaccines were studied in BALB/c mice immunized by physical methods of administration (electroporation and jet injection) in this study. It has been shown that the delivery methods used induce the formation of a high level of humoral and T-cell immune response, providing protective immunity against the SARS-CoV-2.

Распространение SARS-CoV-2 стимулировало разработку вакцин на основе нуклеиновых кислот. Преимущества вакцин на основе ДНК и мРНК заключаются в следующем: подобно рекомбинантным вирусным векторам, они индуцируют Т-клеточный и гуморальный иммунитет при относительно хорошем профиле безопасности. Производство вакцин на основе нуклеиновых кислот значительно быстрее, проще и безопаснее, чем производство живых аттенуированных или субъединичных вакцин.

Основным недостатком ДНК- и мРНК-вакцин является их низкая иммуногенность при введении в виде «голой» нуклеиновой кислоты. В попытках повысить их иммуногенность был разработан широкий спектр стратегий, включая упаковку в липосомы и в поликатионные полимеры, доставку с помощью генной пушки, безыгольную инъекцию и электропорацию. Ранее нами в ГНЦ ВБ «Вектор» был проведен ряд исследований по разработке и оптимизации протоколов электропорации и струйной инъекции на модельной плазмиде pHMGFP и мРНК-GFP, кодирующих зеленый флуоресцентный белок. В данной работе проведено изучение формирования иммунного ответа на мышах линии BALB/c с использованием ДНК-плазмиды pVAXrbd и мРНК-RBD, кодирующих рецептор-связывающий домен вируса SARS-CoV-2.

Иммунизацию проводили в мышцу левой задней лапы мыши. Для снижения болевого синдрома применялся ингаляционный наркоз животных с применением 2,5%-го изофлурана. Волосяной покров удаляли в месте введения с помощью геля для депиляции. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 21 день. В качестве контроля использовались те же препараты экспериментальных вакцин на группах животных, иммунизированных внутримышечно.

Для осуществления процедуры электропорации по протоколу: 3 импульса, прямой и обратной полярности с напряжением 12В, длительностью 50:950 мс и ограничением силы тока в 45 мА, вводили вакцинный препарат с использованием инсулиновых шприцев с иглами 29G, а затем сразу проводили ЭП с помощью электропоратора CUY21 EDIT II (BEX Co., Ltd., Япония) и электрода-пинцета LF 650P5 5 мм (BEX Co., Ltd., Япония). Для введения препаратов вакцин струйной инъекцией использовали опытный образец безыгольного струйного инжектора со следующими характеристиками: скорость потока 220 м/с, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 с.

На 10-й день после второй иммунизации часть мышцей умерщвляли и собирали их кровь и селезенки для дальнейшего анализа иммуногенности, а другая часть была передана для исследования протективных свойств против гамма-варианта вируса SARS-CoV-2 (рис. 1, 2).

^{*} Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

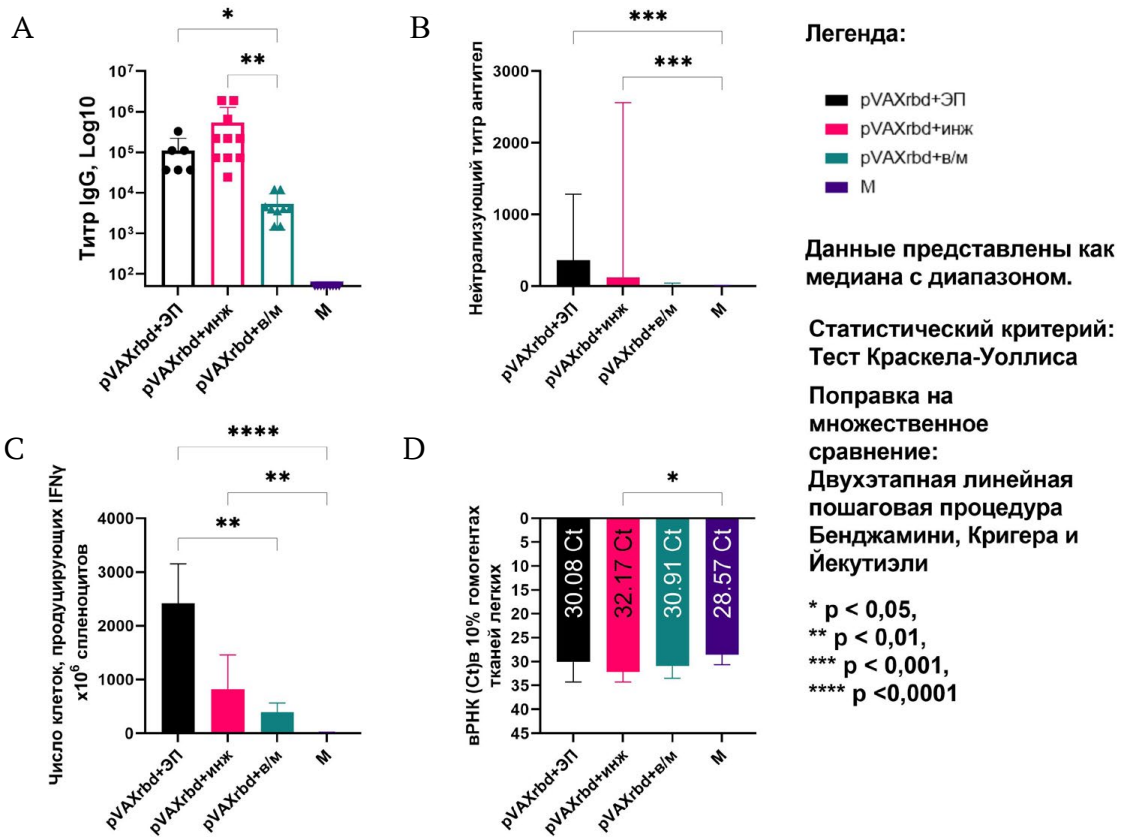


Рис. 1. Анализ иммуногенных и протективных свойств pVAXrbd, доставленной с помощью электропорации и струйной инъекции

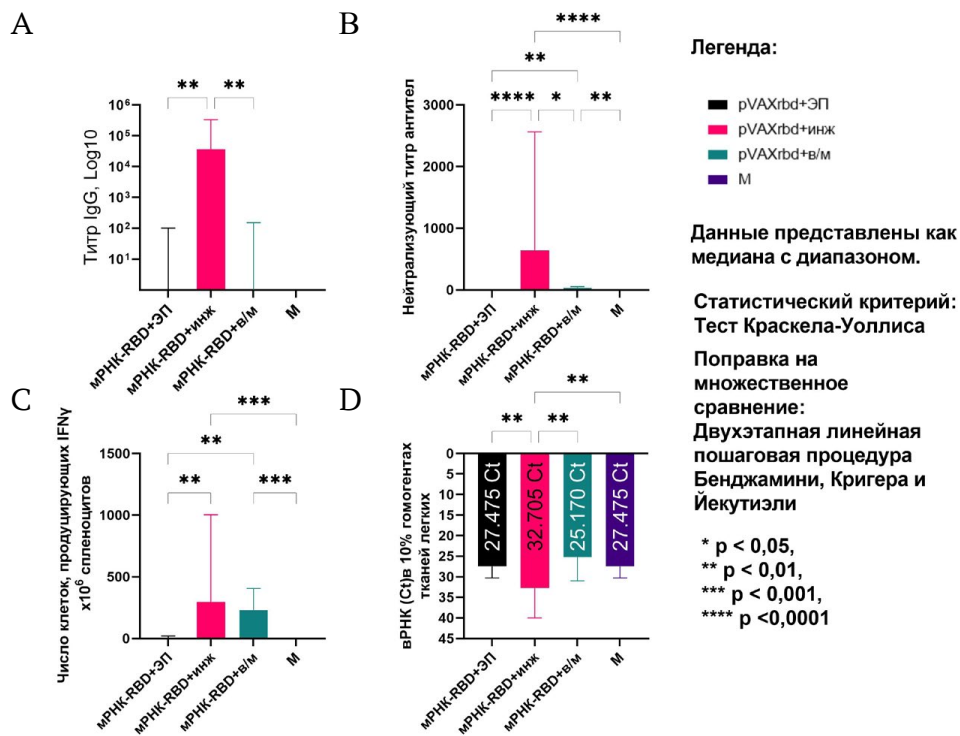


Рис. 2. Анализ иммуногенных и протективных свойств mRНК-RBD, доставленной с помощью электропорации и струйной инъекции

Экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен вируса SARS-CoV-2, обеспечивает формирование высокого гуморального и клеточного иммунного ответа у иммунизированных лабораторных животных с помощью метода электропорации. В случае иммунизации с помощью струйной инъекции показано формирование обоих звеньев иммунного ответа и снижение вирусной нагрузки гамма-варианта SARS-CoV-2 в тканях легких мышей BALB/c. Показано, что экспериментальная вакцина мРНК-RBD, введенная струйной инъекцией, гораздо эффективнее индуцирует оба звена иммунитета, включая индукцию вируснейтрализующих антител, в отличие от внутримышечного введения «голой» мРНК.

Таким образом, физические методы доставки (струйная безыгольная инъекция и электропорация) способны обеспечивать повышение иммуногенности ДНК- и мРНК-вакцин, формируя оба звена иммунного ответа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-182

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КАРДИОПЛЕГИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ НОРМАКОР И КУСТОДИОЛ
НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ НА СЕРДЦЕ*

COMPARISON OF THE EFFECTS OF CARDIOPLEGIC SOLUTIONS NORMACOR
AND CUSTODIOL ON THE RESTORATION OF ELECTROPHYSIOLOGICAL ACTIVITY
OF HUMAN CARDIOMYOCYTES FOLLOWING CARDIAC SURGERY

С. Г. Коваленко, Ш. Р. Фролова, К. И. Агладзе

*Московский физико-технический институт, Долгопрудный
Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*

S. G. Kovalenko, S. R. Frolova, K. I. Agladze

*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*

✉ sandaara.romanova@phystech.edu

Аннотация

Исследование посвящено изучению восстановления потенциалзависимых ионных каналов в кардиомиоцитах человека после операции на сердце. Был оптимизирован протокол выделения зрелых кардиомиоцитов из биоптата и выявлен характер восстановления кальциевых каналов L-типа, быстрых натриевых и медленных калиевых каналов после операций с использованием кардиоплегических растворов Кустодиол и Нормакор.

Abstract

The study focuses on investigating the restoration of voltage-gated ion channels in human cardiomyocytes after cardiac surgery. A protocol for isolating mature cardiomyocytes from biopsy samples was optimized, and the restoration pattern of L-type calcium channels, fast sodium channels and slow potassium channels following surgeries using cardioplegic solutions Custodiol and Normacor was identified.

В данном исследовании изучается один из возможных факторов возникновения послеоперационных аритмий — остаточное влияние кардиоплегического раствора на восстановление потенциалзависимых ионных каналов человеческих кардиомиоцитов после операции на сердце.

Цель исследования — методом пэтч-кламп сравнить электрофизиологические характеристики кальциевых каналов L-типа (I_{Ca} , L), быстрых натриевых каналов (I_{Na_v}) и медленных калиевых каналов (I_K) зрелых кардиомиоцитов человека, полученных из биоптата ушка правого предсердия, после операций с использованием кардиоплегических растворов Кустодиол и Нормакор.

Зрелые кардиомиоциты человека были выделены из биоптата правого предсердия с использованием оптимизированного протокола в лабораторных условиях с применением проназы и коллагеназы II типа [1]. Исследованы три группы данных с биоптатов: 1) биоптат иссечен до введения кардиоплегического раствора в сердце (контрольная); 2) биоптат иссечен после отмыва сердца от кардиоплегического раствора Кустодиол; 3) биоптат иссечен после отмыва сердца от кардиоплегического раствора Нормакор. В рамках исследования понятия «после Кустодиола» или «после Нормакора» означают после восстановления сердечного ритма пациента в операциях с использованием соответствующего кардиоплегического раствора. Регистрация токов проводилась при физиологической температуре.

Из экспериментальных данных пэтч-кламп были построены вольтамперные кривые для Ca -, Na - и K -каналов. Было показано, что кальциевый канал L-типа был восстановлен в одинаковой степени: на 69 % после Кустодиола и на 74 % после Нормакора. I_{Na_v} восстанавливался после операций с Кустодиолом на 91 %, а после операций с Нормакором — на 97 %. В случае последнего наблюдался сдвиг кривой активации вправо на ~ 13 мВ. Что касается медленных калиевых каналов, то после Кустодиола I_K частично восстанавливался на 69 %, однако после Нормакора I_K практически достигал контрольных значений (94 %). Все записи токов, характеризующие восстановление каналов, были сделаны в среднем через 7 ч после операций.

* Работа выполнена при поддержке государственного гранта № 55 Московского областного клинического научно-исследовательского института им. М. Ф. Владимирского и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (Соглашение № 075-03-2023-106 от 13.01.2023 г.).

Далее был проведен анализ наличия послеоперационных осложнений у пациентов в группах, где биоптат был иссечен после отмыва от Кустодиола и Нормакора. Наблюдалось три типа осложнений: фибрилляция предсердий (ФП), удлинение интервала PQ, предсердная экстрасистола (см. таблицу).

Послеоперационное восстановление пациентов

Кардиоплег. раствор	Кол-во операций	ФП, %	Удлинение PQ, %	Экстрасистола предсердия, %	Без изменений, %
Кустодиол	7	14	0	43	43
Нормакор	7	14	72	14	0

В обеих группах зафиксировано по одному случаю фибрилляции предсердий, что составило ~ 14 % от всех операций в каждой группе. Удлинение PQ наблюдалось у 5 пациентов из группы после Нормакора (~ 72 %). Предсердные экстрасистолы были зарегистрированы в обеих группах: после Кустодиола у ~ 43 % (3 пациента из 7), после Нормакора у ~ 14 % (1 пациент из 7). У 3 из 7 пациентов в группе после Кустодиола никаких изменений или осложнений после операций не наблюдалось.

По результатам данного исследования восстановление кальциевого канала L-типа (после обоих кардиоплегических растворов) и медленного калиевого канала (после Кустодиола) происходит после операции не сразу, что может вызывать аритмии. Полученные данные следует учитывать в ходе послеоперационной терапии пациентов.

Литература

1. Патент № 2749986 С1. Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006/01), G09B 23/28 (2006.01), C12N 5/077 (2010.01). Способ выделения кардиомиоцитов из ткани сердца человека : № 2020138993 : заявл. 27.11.2020 : опублик. 21.06.2021 / Д. В. Шумаков, К. И. Агладзе, Д. И. Зыбин и др.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-183

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ TH-232 НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ КЛЕТочНЫЕ СИСТЕМЫ.
РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА****STUDYING THE EFFECT OF TH-232 ON BIOLUMINESCENT CELLULAR SYSTEMS.
THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES**О. В. Колесник^{1,4}, Т. В. Рожко², А. С. Сачкова³, Н. С. Кудряшева^{1,4}¹Институт биофизики СО РАН, Красноярск²Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого³Томский политехнический университет⁴Сибирский федеральный университет, КрасноярскO. V. Kolesnik^{1,4}, T. V. Rozhko², A. S. Sachkova³, N. S. Kudryasheva^{1,4}¹Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk²Prof. V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University³Tomsk Polytechnic University⁴Siberian Federal University, Krasnoyarsk

✉ OV.Kolesnik@yandex.ru

Аннотация

Несмотря на распространенность тория в экосистеме, его влияние на живые организмы не изучено. Морские люминесцентные бактерии являются оптимальным биотестом для изучения последствий низкодозового воздействия тория. Мы обнаружили, что при воздействии низких доз тория (< 0,01 Гр) происходили активация биолюминесценции бактерий и снижение содержания активных форм кислорода в бактериальной суспензии.

Abstract

Despite the prevalence of thorium in the ecosystem its effect on living organisms has not been studied. Marine luminescent bacteria is an optimal bioassay for studying the effects of low-dose thorium exposure. We observed activation of bioluminescence under low-dose exposures (< 0.01 Gy) and decay of the content of reactive oxygen species in the bacterial suspensions.

Альфа-излучающий радионуклид торий является одним из наиболее распространенных радиоактивных элементов в природных экосистемах, наряду с ураном он является важным источником ядерной энергии. Долгоживущий изотоп, торий-232, имеет период полураспада $14 \cdot 10^9$ лет. В окружающей среде торий присутствует в следовых количествах в фосфатах, простых и множественных оксидах и силикатах. Также торий встречается в угле, который используется для топлива в городских тепловых электростанциях. Существуют обширные территории, загрязненные торием, которые могут оказывать пагубное воздействие на биообъекты в течение десятилетий. Эта проблема мотивирует современные исследования токсичности тория на клеточном и молекулярном уровнях [1–3]. Однако в настоящее время воздействие радиоактивного тория на живые организмы изучено недостаточно.

Люминесцентные бактериальные биотесты являются подобными системами для мониторинга радиотоксичности. В качестве физиологического тестируемого параметра используется интенсивность биолюминесценции. Преимущества этого биотеста: высокая чувствительность, простота, скорость анализа (1–3 мин) и доступность устройств для регистрации. Эти преимущества обеспечивают возможность проведения многочисленных анализов и оптимальной статистической обработки. Это важно для изучения эффектов низких доз, которые, как известно, характеризуются стохастичностью [4, 5].

В ходе жизнедеятельности бактерии продуцируют активные формы кислорода (АФК), которые являются естественными побочными продуктами метаболических окислительных процессов и играют важную роль в поддержании гомеостаза и в передаче клеточных сигналов (внутриклеточные мессенджеры). Радиоактивное ионизирующее излучение также способно изменять производство АФК. Это было продемонстрировано в статье Т. В. Рожко с соавт. [4], где было показано, что АФК участвуют в активации физиологических функций люминесцентных бактерий под действием бета-излучающего радионуклида трития.

В качестве объекта исследования были использованы интактные бактерии *Photobacterium phosphoreum*. Источником облучения служил азотнокислый Th-232 ($\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); доза облучения бактериальной культуры

не превышала 0,1 Гр — условную границу низких доз. Была изучена кинетика люминесценции бактерий в растворах различной концентрации Th-232 (10^{-11} – 10^{-5} М), одновременно определялось содержание АФК с помощью хемилюминесцентного люминольного метода. Измерения интенсивности биолюминесценции и хемилюминесценции проводили с помощью планшетного люцинометра Luminoskan Ascent (Thermo Fisher Corp.). Все измерения проводились при +20 °С.

Было обнаружено, что торий-232 умеренно (до 50 %) активизирует биолюминесцентную активность бактерий при низкодозовом облучении (< 0,01 Гр). Выявлена отрицательная корреляция между интенсивностью биолюминесценции бактерий и содержанием АФК ($r = -0,60$; $p < 0,05$) в диапазоне низких концентраций тория (10^{-11} – 10^{-6} М). Можно сделать вывод, что активация бактериальной биолюминесценции связана с усилением окислительно-восстановительных процессов в водных средах и потреблением бактериями АФК.

Полученные результаты способствуют пониманию молекулярного механизма «горемезисных» ответов клеток на низкоинтенсивные радиоактивные воздействия. Результаты выявляют особенности механизма воздействия низкоинтенсивного радиоактивного облучения на живые организмы и способствуют дальнейшей адаптации биолюминесцентных методов к целям радиэкологического мониторинга.

Литература

1. Oliveira M. S., Duarte I. M., Paiva A. V. et al. The role of chemical interactions between thorium, cerium, and lanthanum in lymphocyte toxicity // Archives of Environmental and Occupational Health. 2014. Vol. 69. P. 40–45.
2. Zhu Z. Effects of thorium on paddy soil enzymes and microbial diversity // Radioprotection. 2019. Vol. 54. P. 219–224.
3. Doose C., Morin S., Malbezin L. et al. Effects of thorium on bacterial, microalgal and micrometazoan community structures in a periphytic biofilm // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021. Vol. 218. P. 112276.
4. Rozhko T. V., Nogovitsyna E. I., Badun G. A. et al. Reactive Oxygen Species and low-dose effects of tritium on bacterial cells // Journal of Environmental Radioactivity. 2019. Vol. 208. P. 106035.
5. Yamauchi M., Sakuma S. Development of bioassay system for evaluation of materials for personal protective equipment (PPE) against toxic effects of ionizing radiations // Industrial Health. 2017. Vol. 55. P. 580–583.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-184

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ
G-КВАДРУПЛЕКС-ПОРФИРИН И АЛЬБУМИН-ПОРФИРИН МЕТОДАМИ ЭПР
И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ***

**EPR AND MOLECULAR MODELING STUDIES OF
G-QUADRUPLEX-PORPHYRIN AND ALBUMIN-PORPHYRIN COMPLEXES**

М. И. Колоколов^{1,2}, Н. И. Санникова^{1,2}, Т. А. Хлынова^{1,2},
А. С. Чубаров³, М. В. Федин¹, О. А. Крумкачева¹

¹Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

M. I. Kolokolov^{1,2}, N. I. Sannikova^{1,2}, T. A. Khlynova^{1,2},
A. S. Chubarov³, M. V. Fedin¹, O. A. Krumkacheva¹

¹International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ m.kolokolov@tomo.nsc.ru

Аннотация

Порфириновые фотосенсибилизаторы являются перспективными агентами для фотодинамической терапии рака. Мы применили методы лазерно-индуцированного дипольного ЭПР и компьютерного моделирования для характеристики их взаимодействия с G4-квадруплексами ДНК и человеческим сывороточным альбумином, определена пространственная структура комплексов.

Abstract

Porphyrin photosensitisers are promising agents for photodynamic therapy of cancer. We have used laser-induced dipole EPR and computer modelling techniques to characterise their interaction with G4-quadruplexes of DNA and human serum albumin, and to determine the spatial structure of the complexes.

Связывание G-квадруплексных структур (G4) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с фотосенсибилизаторами представляет интерес для биомедицинской химии и создания новых лекарственных препаратов в связи с их многообещающим потенциалом в фотодинамической терапии рака. Известно, что комплексы G4-квадруплекс-фотоагент изменяют свою структуру в результате взаимодействия с лигандами или под воздействием света. Понимание этих модификаций необходимо для раскрытия биологических ролей комплексов и оптимизации их терапевтического потенциала. Кроме этого, человеческий сывороточный альбумин играет ключевую роль в транспортировке фотосенсибилизаторов в опухолевые ткани. Структурное разнообразие таких комплексов затрудняет изучение их связывания с лигандами, из-за чего возникает необходимость использования дополнительных физико-химических методов исследования. В данной работе мы впервые применили лазерно-индуцированный дипольный ЭПР (электронный парамагнитный резонанс) в качестве метода для характеристики комплексов потенциальных терапевтических мишеней, содержащих фотосенсибилизатор. В качестве демонстрации метода мы исследовали комплексы теломерного G-квадруплекса человека (HTel-22) с катионным порфирином TMPyP4 и комплексы альбумина с рядом анионных и катионных порфиринов.

Для интерпретации экспериментальных данных и определения сайтов связывания лигандов с биомолекулами был разработан новый подход к моделированию распределений расстояний между введенной спиновой меткой и порфиринами. Моделирование состояло из поиска возможных сайтов связывания порфиринов с помощью слепого молекулярного докинга и отбора подходящих комплексов на основе эксперимента. Подвижность комплексов учитывалась с помощью проведения молекулярной динамики. Была написана собственная программа,

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-73-10239.

позволяющая моделировать распределения расстояний для каждого кадра траектории молекулярной динамики с учетом всех возможных конформаций спиновой метки.

Были определены конфигурации комплексов порфирина TmPyr4 с квадруплексом HTel-22 и сайты связывания ряда анионных и катионных порфиринов с человеческим сывороточным альбумином. Результаты моделирования соотносятся с экспериментальными распределениями с хорошей точностью. Наши результаты демонстрируют потенциал ЭПР-спектроскопии для изучения комплексов биологических молекул с фотосенсибилизаторами и способствуют развитию подходов фотодинамической терапии, связанных с применением порфириновых фотоагентов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-185

IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОРОДНОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСОВ ОПУХОЛЕЙ ПРИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ МЕТОДОМ PLIM/FLIM***IN VIVO STUDY OF THE OXYGEN AND METABOLIC STATUS OF TUMORS DURING ANTI-TUMOR THERAPY USING THE PLIM/FLIM METHOD**А. Д. Комарова^{1,2}, С. Д. Синюшкина¹, А. М. Можеров¹, И. С. Критченков³,
С. П. Туник³, И. Н. Дружкова¹, В. И. Щеславский¹, М. В. Ширманова¹¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород²Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского³Санкт-Петербургский государственный университетA. D. Komarova^{1,2}, S. D. Sinyushkina¹, A. M. Mozherov¹, I. S. Kritchenkov³,
S. P. Tunik³, I. N. Druzhkova¹, V. I. Shcheslavskiy¹, M. V. Shirmanova¹¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod³Saint Petersburg State University

✉ komarova.anastasii@gmail.com

Аннотация

В работе представлены результаты исследования кислородного и метаболического статусов опухолей в моделях *in vivo* с помощью время-разрешенной PLIM/FLIM микроскопии. Впервые показана возможность одновременной оценки кислородного статуса опухолей *in vivo* с помощью нового фосфоресцентного сенсора на основе иридия (III) и метаболического статуса по автофлуоресценции кофактора НАД(Ф)Н и продемонстрированы изменения на фоне антиангиогенной терапии.

Abstract

The paper presents the results of a study of the oxygen and metabolic status of tumors in *in vivo* models using time-resolved PLIM/FLIM microscopy. The possibility of simultaneous assessment of the oxygen status of tumors *in vivo* using a new phosphorescent sensor based on iridium and the metabolic status by autofluorescence of the NAD(P)H cofactor was shown for the first time, and changes were demonstrated against the background of antiangiogenic therapy.

Опухолевые клетки приспособлены к неограниченной пролиферации в условиях гипоксии и переменного содержания кислорода путем переключения метаболических путей. Тем не менее вопрос о регулирующем действии кислорода и его вкладе в метаболическую гетерогенность опухолей остается неизученным. При проведении антиангиогенной терапии происходит блокирование факторов роста кровеносных сосудов, в результате процесс образования новых капилляров замедляется, поступление кислорода и питательных веществ к клеткам опухоли нарушается. Методы визуализации кислородного статуса и метаболизма на основе двухфотонной микроскопии с временным разрешением PLIM/FLIM являются перспективными инструментами для *in vivo* исследований в экспериментах на опухолевых моделях.

Целью работы было исследование метаболического и кислородного статусов методами PLIM/FLIM микроскопии в моделях опухолей *in vivo* при анти-VEGF терапии.

Исследования проводили на модели опухоли СТ26 (колоректальный рак мыши), привитой на ухо мышам линии Balb/c (n = 20). Терапию с использованием препарата Авастин начинали на 7-й день роста опухоли, когда опухолевые узлы были сформированы (объем 5–10 мм³) и имели собственную сосудистую сеть. Группа леченых мышей (n = 5) получала препарат в дозе 10 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней. Контролем являлись лабораторные животные (n = 5) без лечения. На 12-й день роста проводили исследование всех опухолей методами PLIM/FLIM-микроскопии на лазерном сканирующем микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Фосфоресценцию кислородного сенсора ISK9 и автофлуоресценцию кофактора НАД(Ф)Н возбуждали на длине волны 750

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-13-00132.

© А. Д. Комарова, С. Д. Синюшкина, А. М. Можеров, И. С. Критченков, С. П. Туник, И. Н. Дружкова, В. И. Щеславский, М. В. Ширманова, 2023

нм в двухфотонном режиме. Флуоресценцию НАД(Ф)Н детектировали в диапазоне 450–490 нм, фосфоресценцию ISK9 — 495–690 нм. Полученные PLIM и FLIM микроскопические изображения обрабатывали в программе SPCImage 8.5. Для верификации данных, полученных методом PLIM, была проведена оценка гипоксической фракции в опухолевой ткани с использованием пимонидазола.

Нами разработана методика одновременной визуализации кислородного и метаболического статусов с помощью двухфотонной микроскопии *in vivo* при одновременном возбуждении кислородного сенсора и метаболического кофактора НАД(Ф)Н. Разработан протокол визуализации нового фосфоресцентного сенсора в опухолях *in vivo* методом PLIM на LSM 880: локальная инъекция раствора ISK9 (250 мкМоль в 2 мкл PBS) за 30 мин до проведения эксперимента, время накопления сигнала фосфоресценции 120 с при мощности лазера 6 мВт.

Размер опухолей после лечения статистически значимо отличался от контрольных опухолей на 12-й день роста: объем контрольных опухолей составил $60,9 \pm 5,1$ мм³, объем опухолей после лечения — $49,3 \pm 6,2$ мм³. Методом PLIM-микроскопии установлено, что при лечении в опухолях возрастает время жизни фосфоресценции сенсора кислорода по сравнению с контрольными опухолями, что свидетельствует о развитии гипоксии. Методом FLIM-микроскопии проведена оценка метаболического статуса опухолей СТ26 после лечения. Оценка параметров затухания флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н *in vivo* показала, что в группе леченых опухолей после воздействия препаратом Авастин среднее время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н статистически значимо снижалось с 0,7 нс в контрольной группе до 0,5 нс. Обнаружена тенденция к увеличению вклада свободной формы кофактора НАД(Ф)Н a1, ассоциированного с гликолизом, в группе леченых опухолей с 79,7 % до 82,3 %. Полученные результаты свидетельствуют о сдвиге метаболического статуса в группе леченых опухолей в сторону более гликолитического метаболизма, что согласуется с их более гипоксичным статусом. Методом иммуногистохимии с использованием стандартного маркера гипоксии, пимонидазола, установлено, что в опухолевой ткани при лечении увеличивается гипоксическая фракция клеток.

Таким образом, в результате исследования впервые показана возможность оценки кислородного статуса опухолей *in vivo* с помощью нового сенсора кислорода и продемонстрированы изменения кислородного и метаболического статусов на фоне терапии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-186

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ С ТРАНСМЕМБРАННЫМ ДОМЕНОМ Е-БЕЛКА SARS-COV-2 В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ ***INTERACTION OF ANTIVIRAL TRITERPENOIDS WITH THE TRANSMEMBRANE DOMAIN OF THE SARS-COV-2 E-PROTEIN IN A MODEL MEMBRANE**П. А. Кононова¹, О. Ю. Селютин¹, В. В. Фоменко², Н. Э. Поляков¹¹*Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*P. A. Kononova¹, O. Yu. Selyutina¹, V. V. Fomenko², N. E. Polyakov¹¹*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS, Novosibirsk*²*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉ kononova_polina@bk.ru

Аннотация

Исследовано взаимодействие глицирризиновой кислоты (ГК) и глицивира с трансмембранным доменом Е-белка SARS-CoV-2 в модельных липидных мембранах методами ядерного магнитного резонанса. Было показано наличие взаимодействия ГК, глицивира и пептида с липидами бислоя, обнаружено влияние ГК на подвижность как липидов, так и молекул пептида и взаимное влияние пептида и противовирусных средств на локализацию в мембране.

Abstract

The interaction of glycyrrhizic acid (GA) and glycyvir with the transmembrane domain of the SARS-CoV-2 E-protein in model lipid membranes was studied by nuclear magnetic resonance methods. The interaction of GA, glycyvir, and the peptide with bilayer lipids was shown, the effect of GA on the mobility of both lipids and peptide molecules and the mutual influence of the peptide and antiviral agents on localization in the membrane was found.

Вирусы, вызвавшие последние крупные вспышки: ближневосточный респираторный синдром (2012), геморрагическая лихорадка Эбола (2014), лихорадка Зика (2015), COVID-19 (2019), являются оболочечными. Липидная мембрана вириона представляет собой потенциальную мишень для противовирусных препаратов, так как играет критическую роль в слиянии вирусной и клеточной мембраны. Более того, перспективным подходом является исследование путей воздействия на консервативные трансмембранные домены белков оболочки вируса.

SARS-CoV-2 — оболочечный одноцепочный (+)РНК-вирус. Как и другие коронавирусы, SARS-CoV-2 имеет 4 структурных белка: S, E, M и N. Согласно литературным данным, белки E и M являются необходимыми для формирования вирусоподобных частиц. Ингибирование E-белка снижает вирусную патогенность, что позволяет предположить, что E-белок является потенциальной противовирусной мишенью. E-белок SARS-CoV-2 состоит из трех доменов: трансмембранного домена (ТМД), промежуточного спирального домена и N- и C-концевых доменов. E-белок образует гомопентамерный катионный канал в липидной мембране. В работе исследовалось взаимодействие потенциальных противовирусных средств с ТМД E-белка.

Глицирризиновая кислота (ГК) — тритерпеновый сапонин корня солодки (*Glycyrrhiza glabra*), амфифильная молекула. ГК и ее производные являются перспективными биологически активными соединениями для создания противовирусных средств широкого спектра действия. В данной работе исследованы ГК и ее производная (глицивир), полученная ацилированием никотиновой кислотой. Глицивир представляет собой многокомпонентную смесь, содержащую в основном моно-, ди-, три- и тетраникотинаты. Имеются данные об активности ГК и глицивира в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*.

Исследования проводилось на модели липидной мембраны — липидных бицеллах (дискообразная модель биомембраны). Использовались классические бицеллы — смесь ДМФХ (димиристоилфосфатидилхолина) и ДГФХ (дигексаноилфосфатидилхолина), а также заряженные бицеллы содержащие ДМФС (димиристоилфосфатидилсерин) и ДМФХ в отношении 1:1. Исследование проводилось методами ЯМР-спектроскопии в жидкости. Методом селективного NOESY (sNOESY, selective nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy) исследова-

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-1580.2021.1.3.

© П. А. Кононова, О. Ю. Селютин, В. В. Фоменко, Н. Э. Поляков, 2023

лось пространственная близость ($< 0,5$ нм) различных групп атомов. По изменению времен релаксации (T_1) оценивалось изменение подвижности молекул.

Присутствие в мембране ТМД способствует более глубокому проникновению ГК и глицивира в центр бислоя. Кроме того, ТМД способствует самоассоциации молекул ГК, а фенилаланин ТМД взаимодействует с ГК внутри липидного бислоя при нейтральном рН. ГК, в свою очередь, влияет на локализацию ТМД в липидном бислое. Кроме того, ГК влияет на подвижность протонов ТМД в бислое. Изменение подвижности трансмембранного домена может влиять на активность Е-белка.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-187

**БИОПЕЧАТЬ ГИДРОГЕЛЕМ НА ОСНОВЕ КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ,
СОДЕРЖАЩИМ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ****BIOPRINTING WITH XANTHAN GUM HYDROGEL CONTAINING CARBON NANOTUBES**

С. В. Кравченко

*МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова», Краснодар
Кубанский государственный технологический университет, Краснодар*

S. V. Kravchenko

*Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Krasnodar
Kuban State Technological University, Krasnodar*

✉ ksv.1991@yandex.ru

Аннотация

Биопечать (биопринтинг) — перспективный метод получения тканеинженерных конструкций для нужд регенеративной медицины и моделирования физиологических процессов. В данной работе представлено краткое описание результатов экспериментов по биопечати гидрогелем на основе ксантановой камеди, содержащим углеродные нанотрубки.

Abstract

Bioprinting is a perspective method of tissueengineered constructions fabrication for regenerative medicine and physiological processes modelling. This study presents brief results of experiments on bioprinting with xanthan gum hydrogel containing carbon nanotubes.

Биопечать (биопринтинг) позволяет из живых клеток, биополимеров и иных материалов создавать аддитивным способом биоинженерные структуры с заданной двух- или трехмерной пространственной организацией [1, 2], которые могут быть использованы для нужд регенеративной медицины и для изготовления систем «орган-на-чипе». В качестве биочернил для биопринтера могут быть использованы различные материалы, такие как альгинат, коллаген, желатин, гиалуроновая кислота и др. [3], применяемые в различных сочетаниях и нередко подвергаемые модификации посредством добавления различных функциональных групп или внесения наночастиц [4].

Ксантановая камедь — полисахарид биологического происхождения, получаемый из бактерий, применяется в сфере биопринтинга в качестве временного материала для печати поддерживающих конструкций [5], также может быть использована как загуститель для получения биочернил с необходимыми реологическими свойствами. Углеродные нанотрубки обладают биосовместимостью и электрической проводимостью, способны изменять реологические свойства гидрогелей. Вышеописанные свойства обуславливают интерес к углеродным нанотрубкам как к перспективному классу наночастиц для придания биочернилам требуемых реологических и механических свойств и получения, в перспективе, обладающих электропроводностью биосовместимых материалов.

Цель работы — разработка биочернил на основе ксантановой камеди, содержащих углеродные нанотрубки, и протокола печати полученным материалом.

Были приготовлены биочернила, содержащие ксантановую камедь и желатин, в которые по разработанному протоколу были внесены углеродные нанотрубки. Использовался биопринтер экструзионного типа собственной разработки. В процессе печати материал наносился на дно чашки Петри диаметром 60 мм. Был распечатан паттерн в виде решетки 4 × 4 ячейки, а также пробный паттерн в виде зигзагообразных дорожек с контактными площадками. На испытанных скоростях перемещения печатающей головки и подачи материала удалось добиться высокой степени геометрического соответствия напечатанного паттерна его цифровой модели. Был определен оптимальный диаметр сопла для подачи биочернил, при котором удается получить требуемый уровень точности печати при использовании разработанного состава.

Таким образом, в ходе проведенной работы удалось получить содержащие углеродные нанотрубки биочернила, обладающие реологическими свойствами, необходимыми для печати биопринтером экструзионного типа. Разработанные биочернила и протоколы биопечати ими могут быть применены при изготовлении токопроводя-

щих элементов в составе систем «орган-на-чипе» для регистрации биоэлектрической активности возбудимых тканей и их стимуляции. Кроме того, технология имеет перспективу разработки на ее основе биопечатных гибких электродных матриц для зрительных, когнитивных и иных нейропротезов.

Литература

1. Kačarević Ž. P., Rider P. M., Alkildani S. et al. An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects // *Materials*. 2018. Vol. 11 (11). P. 2199.
2. Daly A. C., Prendergast M. E., Hughes A. J., Burdick J. A. Bioprinting for the Biologist // *Cell*. 2021. Vol. 184 (1). P. 18–32.
3. Zhang Y., Zhou D., Chen J. et al. Biomaterials Based on Marine Resources for 3D Bioprinting Applications // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17 (10). P. 555.
4. Li H., Liu S., Lin L. Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide // *International Journal of Bioprinting*. 2016. Vol. 2 (2). P. 54–66.
5. Liu S., Wang T., Li S., Wang X. Application status of sacrificial biomaterials in 3D bioprinting // *Polymers*. 2022. Vol. 14 (11). P. 2182.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-188

ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МЕТОДАМИ FLIM И ПЦР-PB В EX VIVO ОБРАЗЦАХ***ASSESSMENT OF THE LIVER STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE WITH TOXIC DAMAGE BY FLIM AND REAL-TIME PCR USING EX VIVO SAMPLES**Д. П. Крылов^{1,2}, Д. С. Козлов^{1,2}, С. А. Родимова¹, А. М. Можеров^{1,2}, М. М. Карабут¹, Д. С. Кузнецова^{1,2}¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород²Нижегородский государственный университет им. Н. И. ЛобачевскогоD. P. Krylov^{1,2}, D. S. Kozlov^{1,2}, S. A. Rodimova¹, A. M. Mozherov^{1,2}, M. M. Karabut¹, D. S. Kuznetsova^{1,2}¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ dmitr.krilow2013@yandex.ru

Аннотация

В работе проводили оценку структурно-функционального состояния ткани печени при токсическом повреждении методами мультифотонной микроскопии и молекулярного анализа на *ex vivo* образцах. В результате выявлены характерные оптические критерии токсического повреждения печени на клеточном уровне, а также изменения уровня экспрессии генов, ассоциированных с токсическим повреждением.

Abstract

In this work, we assessed the structural and functional state of the liver tissue with toxic damage using multiphoton microscopy and molecular analysis of *ex vivo* samples. As a result, we revealed characteristic optical criteria for toxic liver damage at the cellular level, as well as changes in the expression level of genes associated with toxic damage.

Частой причиной развития острой печеночной недостаточности является поступление в организм высоких доз гепатотоксических веществ. При этом актуальной задачей остается поиск новых критериев развития острой или хронической патологии печени. Современные методы, включающие время-разрешенную флуоресцентную микроскопию FLIM и молекулярный анализ уровня экспрессии генов, ассоциированных с токсическим повреждением, расширяют возможности для оценки структурно-функционального состояния ткани печени на клеточном уровне. Данные методы не требуют дополнительного окрашивания и позволяют проводить оценку не только структуры ткани, но и метаболического статуса гепатоцитов. В образцах *ex vivo* (тканевых слайсах) печени сохраняются межклеточные взаимодействия нативной ткани, что позволяет моделировать патологические изменения, вызванные сильными гепатотоксическими агентами — парацетамолом и четыреххлористым углеродом (CCl₄).

Цель работы — оценка структурно-функционального состояния ткани печени при токсическом повреждении методами мультифотонной микроскопии и ПЦР в реальном времени на *ex vivo* модели тканевых слайсов печени.

Для получения тканевых слайсов печени использовали вибрационный микротом 7000smz-2. Полученные образцы помещали в отдельные лунки 12-луночного планшета со стандартной средой DMEM, кондиционированной CO₂, с добавлением 0,1 мкМ дексаметазона и 10 % FBS, и инкубировали при 37 °C на орбитальном шейкере (90 об/мин). Для индукции токсического повреждения слайсы печени помещали на 3 ч в 10 мМ раствор парацетамола, разведенного в DMEM. Для модели токсического повреждения CCl₄ образцы печени инкубировали в течение 3 ч в стандартной среде DMEM в 12-луночном планшете, к крышке которого прикрепляли фрагмент фильтровальной бумаги, пропитанной 10 мкл CCl₄. В качестве контроля использовали слайсы печени, культивированные в среде DMEM без добавления токсинов. Мониторинг проводили через 3 ч, 24 ч и 48 ч инкубации. С применением FLIM проводили анализ метаболического статуса гепатоцитов на основе данных о временах жизни флуоресценции свободной и связанной форм НАДН и НАД(Ф)Н и их вкладов. Оценка уровня экспрессии генов, ассоциированных с развитием токсического повреждения, проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR green и протокола ступенчатой (touchdown) ПЦР.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-25-00098.

В результате были определены характерные оптические критерии токсического повреждения печени, которые были специфичны для каждого токсического агента. Методом мультифотонной микроскопии были выявлены клетки печени как с высокой, так и с низкой интенсивностью аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, что указывает на наличие поврежденных гепатоцитов. Важно отметить, что индуцированное парацетамолом токсическое поражение характеризовалось увеличением вклада связанной формы НАД(Ф)Н, тогда как воздействие CCl_4 показало достоверное снижение вклада связанной формы НАД(Ф)Н, что отражает специфичные отличия в механизмах повреждения каждым токсическим агентом. С применением молекулярного анализа показана тенденция к изменению уровня экспрессии генов, ассоциированных с развитием патологии печени, что согласуется с данными время-разрешенного имиджинга FLIM и стандартного морфологического анализа.

Таким образом, используемый в данной работе подход на основе методов мультифотонной микроскопии и молекулярного анализа эффективен для экспресс-мониторинга состояния ткани печени при токсическом повреждении.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-189

ВЛИЯНИЕ ФИКОЛА70 И ФИКОЛА400 НА ЭНТАЛЬПИЮ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА АНТИГЕН – АНТИТЕЛО В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И БЕВАЦИЗУМАБА ***EFFECT OF FICOL70 AND FICOL400 ON THE ENTHALPY OF FORMATION OF AN ANTIGEN – ANTIBODY COMPLEX IN A MODEL SYSTEM OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND BEVACIZUMAB**

Т. А. Кудряшов, М. П. Шевелева, Е. Л. Немашкалова, Е. И. Дерюшева

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пушкино

T. A. Kudryashov, M. P. Sheveleva, E. L. Nemashkalova, E. I. Deryusheva

Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

✉ kudryashovtimm@gmail.com

Аннотация

Метод биослойной интерферометрии использовался для изучения взаимодействия антигена VEGF-A165 с антителом бевацизумаб в присутствии фикола70 и фикола400. Краудинг-агенты увеличили значения равновесных констант диссоциации (Kd) при 40 °C на порядок, что обусловлено изменением энтальпии ассоциации. Полученные результаты важны для понимания стабильности и специфичности терапевтических антител.

Abstract

The method of bio-layer interferometry was used to study the interaction between the VEGF-A165 antigen and the bevacizumab antibody in the presence of Ficoll 70 and Ficoll 400. The crowding agents increased the equilibrium dissociation constants (Kd) by an order of magnitude at 40 °C, which was caused by the changes in enthalpy of association. These findings are important for understanding the stability and specificity of therapeutic antibodies.

Моноклональные антитела, применяемые в таргетной терапии, выбираются на основе их сродства к целевым мишеням. Однако исследования проводятся в условиях, отличных от физиологических, где присутствуют молекулярные компоненты и ионы, которые могут влиять на взаимодействие антигена и антитела посредством молекулярного краудинга или неспецифических взаимодействий. Кроме того, существующие статистико-термодинамические модели предсказывают повышение термостабильности белков и их комплексов на величину 5–20 °C в физиологических условиях раствора за счет эффектов макромолекулярного краудинга.

В данной работе методом биослойной интерферометрии было проведено изучение температурной зависимости влияния фикола70 (Ficoll®70) и фикола400 (Ficoll®400) на взаимодействие антиген – антитело в модельной системе терапевтического антитела бевацизумаб (BVZ) и его мишени, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A165).

VEGF-A165 — сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования роста новых сосудов. Актуальность исследования свойств VEGF обусловлена его прогностической важностью при развитии различных заболеваний, а также эффективностью антиангиогенной терапии при лечении некоторых видов рака, тромбоза, ретинопатии и макулодистрофии и перспективностью применения терапевтических индукторов ангиогенеза. Бевацизумаб (DrugBank Accession Number, DB00112) представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, которое избирательно связывается и нейтрализует биологическую активность человеческого VEGF-A165. Фикол400 и фикол70 являются распространенными краудинг-агентами и представляют собой разветвленные полимеры разной молекулярной массы, образованные сополимеризацией сахарозы и эпихлоргидрина.

Химически иммобилизованный на биосенсоре VEGF-A165 выступал в качестве лиганда. Концентрация BVZ, выступавшего в качестве аналита, составила 15–30 нМ. Полученная величина равновесной константы диссоциации, Kd, для комплекса BVZ-VEGF-A165 (0,01 нМ) соответствует литературным данным. В качестве целевой добавки использовались 20 % растворы фикола70 и фикола400. Расчет констант взаимодействия лиганда (VEGF-A165) с аналитом (BVZ) при трех разных температурах (20 °C, 30 °C, 40 °C) проводили по схеме связы-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-24-00083.

вания 1:1 с использованием стандартной программы Octet Data Analysis. В присутствии 20 % (масс.) фикола70 значение Kd увеличивается до 2 нМ (20 °С), 4,5 нМ (30 °С) и 50 нМ (40 °С), а в присутствии такого же количества раствора фикола400 значение Kd увеличивается до 0,7 нМ (20 °С), 3 нМ (30 °С), 60 нМ (40 °С).

Изменение Kd обусловлено как увеличением кинетических констант диссоциации, так и уменьшением кинетических констант ассоциации комплекса VEGF-BVZ при увеличении температуры. Значения энтальпии ассоциации VEGF и BVZ, определенные при средней температуре 30 °С в присутствии фикола70 и фикола400, составляют -122 кДж/моль и -171 кДж/моль соответственно. Энтальпия (ΔH) ассоциации VEGF и BVZ в отсутствие краудинг-агентов составляет -105 кДж/моль [1], таким образом, увеличивается суммарный экзотермический эффект образования комплекса VEGF-BVZ, что связано с уменьшением эндотермического эффекта разрыва межмолекулярных связей растворителя [2] в присутствии фикола, причем этот эффект зависит от молекулярной массы полимера.

Дальнейшие исследования в данной области помогут учитывать влияние различных условий на функциональную стабильность и специфичность к мишеням терапевтических антител.

Литература

1. Khalili H., Brocchini S., Khaw P. T., Filippov S. K. Comparative thermodynamic analysis in solution of a next generation antibody mimetic to VEGF // RSC Adv. 2018. Vol. 8. P. 35787–35793.
2. Mukkur T. K. Thermodynamics of hapten-antibody interactions // CRC Crit. Rev. Biochem. 1984. Vol. 16. P. 133–167.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-190

**РАЗРАБОТКА БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЗЕЛеноЙ ЭНЕРГИИ
В ПРОЦЕССЕ ВЫРАЩИВАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ***

**DEVELOPMENT OF A BIOELECTROCHEMICAL SYSTEM FOR OBTAINING GREEN ENERGY
IN THE PROCESS OF AGRICULTURAL PRODUCTS GROWING**

Т. Э. Кулешова, П. В. Желначева, Н. Г. Синявина, А. С. Галушко, Г. Г. Панова

Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург

T. E. Kuleshova, P. V. Zhelnacheva, N. G. Sinyavina, A. S. Galushko, G. G. Panova

Agrophysical Research Institute, Saint Petersburg

✉ www.piter.ru@bk.ru

Аннотация

Создана биоэлектрохимическая система на основе электрогенных свойств корнеобитаемой среды растений. Средняя величина разности потенциалов составила 322 мВ для салата, 323 мВ для редиса, 368 мВ для томата на вегетативной стадии. Листовые культуры обладали лучшими электрическими свойствами, а плодовые позволяли получать более стабильный и длительный по времени выход электроэнергии.

Abstract

Bioelectrochemical systems have been created based on the electrogenic properties of the root environment. The average potential difference was 322 mV for lettuce, 323 mV for radish, and 368 mV for tomato at the vegetative stage. Leaf crops had the best electrical properties, and fruit crops made it possible to obtain a more stable and long-term output of green electricity.

Биоэлектрохимические системы на основе электроактивных процессов в корнеобитаемой среде растений и сопутствующих микроорганизмов, растительно-микробные топливные элементы, представляют собой новый перспективный экологически чистый источник возобновляемой энергии [1]. Производительность биоэлектрохимических систем на основе электрогенных процессов в системе корнеобитаемая среда — растения наряду с конфигурацией устройства и используемыми электродами зависит от целого ряда факторов, включая вид растения и его генетически обусловленный потенциал.

Цель данной работы заключалась в создании биоэлектрохимической системы на основе электрогенных процессов в корнеобитаемой среде для генерации возобновляемой электроэнергии при выращивании различной сельскохозяйственно значимой растительной продукции, включая листовые, плодовые и корнеплодные культуры.

Для выбора растений, наиболее перспективных с точки зрения получения электроэнергии в ходе их выращивания, было проведено исследование электрофизиологических свойств у ряда растений, различающихся эффективностью работы фотосинтетического аппарата и хозяйственной ценностью. В качестве фитотест-объектов были выбраны: 1) листовые зеленые культуры — салат сорта Тайфун; 2) корнеплодные растения — редис сорта Петербургский фиолетовый, выведенный с помощью методов ускоренной селекции специально для интенсивной светокультуры; 3) плодовые овощные культуры — карликовый томат сорта Наташа, компактный и не требующий пасынкования. Растения выращивали в контролируемых условиях интенсивной светокультуры с использованием разработанных светодиодных светильников, имитирующих солнечный свет.

Биоэлектрохимическая система представляла собой емкость для выращивания объемом 440 см³ для салата и редиса, 3000 см³ для томата. Измерение электрических характеристик осуществляли путем размещения биосовместимых коррозионостойких электродов в корнеобитаемой среде, что обеспечивало поверхностный электрических контакт с корневой системой и прикорневой зоной.

В биоэлектрохимических системах на основе салата сорта Тайфун на начальных этапах вегетации (первые 7 дней) наблюдаемая генерация разности потенциалов в корнеобитаемой среде составляла 247 ± 15 мВ. С 7-го по 20-й дни эксперимента наблюдался плавный рост напряжения, среднее значение было 329 мВ, а разброс величин — порядка 40–45 мВ. С 20-го дня зарегистрирована стабилизация разности потенциалов в корнеобитаемой

* Работа выполнена при поддержке гранта Санкт-Петербургского научного фонда и Российского научного фонда № 23-26-10050.

среде на уровне 405 ± 15 мВ. При этом средняя масса растения в конце эксперимента (28-й день) составила $21,3 \pm 7,2$ г, площадь зеленой массы одного растения была 891 см².

Для растений редиса сорта Петербургский фиолетовый средняя величина разности потенциалов в первые 7 суток составляла 406 ± 36 мВ, затем возрастала до 438 ± 27 мВ и через 14 суток снижалась до стационарной 354 ± 40 мВ до конца вегетационного периода. Плотность мощности составила 50 мкВт/м² при внешней нагрузке 51 кОм. Урожай составил $2,63$ кг/м², товарность — 70 %, индекс хозяйственной эффективности — $0,66$.

Среднее значение разности потенциалов в корнеобитаемой среде томатов сорта Наташа составило 368 мВ, а разброс значений на протяжении 45 суток вегетации не превышал 30 мВ, что говорит о высокой стабильности генерации электроэнергии. Для растений томата также была характерна большая величина выходной мощности — при нагрузке 150 кОм она составила $0,3$ мкВт.

Таким образом, средняя величина генерируемой в корнеобитаемой среде разности потенциалов составила 322 мВ для салата сорта Тайфун, 394 для салата сорта Вишневая дымка, 366 мВ для салата сорта Гранатовые кружева, 323 мВ для редиса сорта Петербургский фиолетовый, 368 мВ для томата сорта Наташа на вегетативной стадии. Можно сделать выводы, что листовые культуры обладают лучшими электрическими свойствами, однако плодовые позволяют получать более стабильный и длительный по времени выход электроэнергии.

Литература

1. Kuleshova T., Rao A., Bhadra S. et al. Plant microbial fuel cells as an innovative, versatile agro-technology for green energy generation combined with wastewater treatment and food production // Biomass and Bioenergy. 2022. Vol. 167. P. 106629.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-191

**АНАЛИЗ МЕТОДОМ ЯМР ПЕПТИДА LPRDA – ИНГИБИТОРА СОРТАЗЫ А
ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА*****NMR ANALYSIS OF LPRDA PEPTIDE, AN INHIBITOR OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SORTASE A**Е. С. Кучаев¹, К. В. Кудрявцев², В. В. Клочков³, А. В. Аганов³, К. С. Усачев^{1,3}¹Казанский научный центр РАН²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва³Казанский федеральный университетE. S. Kuchaev¹, K. V. Kudryavcev², V. V. Klochkov³, A. V. Aganov³, K. S. Usachev^{1,3}¹Kazan Scientific Center RAS²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow³Kazan Federal University

✉ e.kuchaev@knc.ru

Аннотация

Фермент сортаза А (SrtA) закрепляет ответственные за вирулентность поверхностные белки и адгезины на клеточной стенке и представляется потенциальной мишенью для борьбы с патогенными бактериями. В рамках данной работы методом спектроскопии ЯМР проанализирована структура в растворе олигопептида LPRDA, который является перспективной основой для создания пептидомиметиков, ингибирующих Сортазу А.

Abstract

The enzyme Sortase A (SrtA) anchors surface proteins and adhesins responsible for virulence on the cell wall and appears to be a potential target for the control of pathogenic bacteria. In the framework of this work, the structure in solution of the oligopeptide LPRDA, which is a promising basis for the development of peptidomimetics inhibiting Sortase A, was analysed by NMR spectroscopy.

Одним из перспективных направлений для преодоления развития устойчивости патогенов к антибиотикам является поиск стратегий фармакологической коррекции антибиотикорезистентности, нацеленной на снижение вирулентности патогенов, без уничтожения или подавления роста бактерий. Фермент сортаза А (SrtA) закрепляет ответственные за вирулентность поверхностные белки и адгезины на клеточной стенке и представляется потенциальной мишенью для борьбы с патогенными бактериями *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*. Сортаза А распознает последовательность из пяти аминокислотных остатков LPX_{TG} (где X — любой остаток) в составе белков адгезинов MSCRAMM, которые опосредуют первоначальное прикрепление бактерий к тканям организма хозяина, что является критическим этапом для развития инфекции [1]. Ранее было показано, что олигопептид LPRDA является перспективной основой для создания пептидомиметиков, ингибирующих Сортазу А [2]. В рамках данной работы методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения были отнесены сигналы ядер ¹H и ¹³C олигопептида LPRDA в воде, рассчитаны двугранные углы, определены межъядерные расстояния и получена структура олигопептида LPRDA в растворе методом молекулярной динамики. Также показано наличие нескольких конформеров пептида в растворе. Полученные данные являются основой для дальнейших исследований структуры и функции пептидомиметиков, созданных на основе олигопептида LPRDA.

Литература

1. Foster T. J., Geoghegan J. A., Ganesh V. K., Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus* // Nature Reviews Microbiology. 2014. Vol. 12. P. 49–62.
2. Abujubara H., Hintzen J. C. J., Rahimi S. et al. Substrate-derived Sortase A inhibitors: targeting an essential virulence factor of Gram-positive pathogenic bacteria // Chemical Science. 2023. Vol. 14. P. 6975–6985.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.
© Е. С. Кучаев, К. В. Кудрявцев, В. В. Клочков, А. В. Аганов, К. С. Усачев, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-192

**СЭМ-ХАРАКТЕРИСТИКА «КЛАДБИЩ» ТЕРАТОМОРФНЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН,
СФОРМИРОВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ВЫСОЧАЙШЕГО РАДИАЦИОННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ
ВБЛИЗИ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС**

**SEM-CHARACTERISTICS OF THE “CEMETERIES” OF TERATOMORPHIC POLLEN GRAINS FORMED
UNDER HIGH RADIATION CONTAMINATION IN THE CHERNOBYL 30-KM EXCLUSION ZONE**

Г. М. Левковская¹, Н. В. Шамаль², В. Ф. Тарасевич³, А. Н. Боголюбова³, А. К. Каспаров¹

¹*Институт истории материальной культуры РАН, Санкт-Петербург*

²*Институт радиобиологии, НАН Беларуси, Гомель*

³*Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург*

G. M. Levkovskaya¹, N. V. Shamal², V. F. Tarasevich³, A. N. Bogolyubova³, A. K. Kasparov¹

¹*Institute for the History of Material Culture RAS, Saint Petersburg*

²*Institute of Radiobiology NAS of Belarus, Gomel*

³*Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg*

✉ ggstepanova@yandex.ru

Аннотация

Получены СЭМ микрографий палинотератных комплексов из отложений с высочайшим загрязнением проб ^{239/240}Pu, ²⁴¹Am, ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs, отобранных в 1988 г. на расстоянии 12, 16 и 22 км от Чернобыльской АЭС. Комплексы выглядят как «кладбища» уродливых или не полностью сформированных и стерильных пыльцевых зерен одновременно всех таксонов. В комплексах экстремумов плейстоцена уродливой пыльцы мало.

Abstract

SEM-micrographs of palynoteral pollen complexes were obtained from the soil samples collected at points with high ^{239/240}Pu, ²⁴¹Am, ⁹⁰Sr and ¹³⁷Cs contamination located 12, 16 and 22 km from the Chernobyl NPP in 1988. The complexes resemble “cemeteries” of monstrous, underdeveloped and sterile pollen of all taxa simultaneously, while in the pollen complexes of Pleistocene extremes monstrous pollen are rare.

Для 30-километровой зоны Чернобыля имеются публикации об отклонениях от палиноморфологических норм пыльцы из пыльников растений, в основном сосны [1, 2]. В отдельных пыльниках найдено до 100 % тератоморфных пыльцевых зерен [3], но пыльца из пыльников, в отличие от комплексов пыльцы из отложений, не отражает состояние территории в целом, а лишь локальные местообитания или отдельные растения, или особенности эндогенного [4] развития конкретного пыльника. Обнаружено много (до 50 %) деформированной пыльцы (по нашей терминологии — уродливой), причем плохой сохранности, в мацератах отложений с теплой стороны дамбы пруда охладителя ЧАЭС [5].

Нами были исследованы пробы, отобранные сотрудниками Института радиобиологии НАН Беларуси, с поверхности современных почв на второй год после Чернобыльской катастрофы, из трех пунктов, находящихся в 30-километровой зоне отчуждения.

Пункт Масаны расположен на расстоянии 12 км от ЧАЭС. Заражение: ^{239/240}Pu — 99, ²⁴¹Am — 150, ⁹⁰Sr — 14 000, ¹³⁷Cs — 52 000 Бк/кг. МЭД на почве 530 мкР/ч.

Пункт Крюки расположен на расстоянии 16 км от ЧАЭС. Заражение: ^{239/240}Pu — 48, ²⁴¹Am — 81, ⁹⁰Sr — 4 500, ¹³⁷Cs — 270 000 Бк/кг. МЭД на почве 2 200 мкР/ч.

Пункт Лесок расположен на расстоянии 22 км от ЧАЭС. Заражение: ^{239/240}Pu — 83, ²⁴¹Am — 140, ⁹⁰Sr — 9 100, ¹³⁷Cs — 84 100 Бк/кг. МЭД на почве 890 мкР/ч.

Объект исследования: пыльца — мужские гаметофиты семенных растений.

СЭМ-исследования были выполнены под руководством Л. А. Карцевой в Центре коллективного пользования БИН РАН на микроскопе SEM JEOL JSM 639LA. Для СЭМ-исследований столики напылялись смесью золота с палладием, но при этом напылялись не отдельные формы, а мацераты [6] с комплексами пыльцы из пробирок. Благодаря этой новации были получены первые в мире 65 СЭМ-микрографий палинотератных комплексов и отдельных форм из отложений с высоким радиоактивным загрязнением.

Для интерпретации комплексов использовалась методика палинотератной дифференциации геоботанических оптимумов и кризисов, разработанная Г. М. Левковской [6–9] на основе палинотератной статистики, собранной в 1958–2022 гг. из экологически чистых отложений 32 палеолитических стоянок [10–14] с палеозоологическими экологическими данными и из современных отложений из Южной Аравии [15] и всех подзон Западной Сибири [17]. Объективность реконструированного на основе этой методики в 2005 г. геоботанического кризиса времени геомагнитного экскурса Лашамп для стоянки «Костенки-12» [12] подтверждена в 2020 г. дендрохронологическими данными из Новой Зеландии [11, 18].

Статистика показала [6, 7], что для палинотератных экологических заключений по территориям необходимо строить специальные диаграммы и рассчитывать процентные соотношения сумм экологически типичных и атипичных форм всех таксонов, а внутри атипичных — проценты: 1) карликовых (KAR), 2) уродливых (UR), 3) недоразвитых или не полностью сформированных (NED) (в соответствии с критериями Е. Н. Анановой [19]) и 4) форм одновременно и карликовых, и уродливых, и недоразвитых (KRIS).

В Чернобыльских поверхностных пробах [20] с помощью СЭМ-микрографий зафиксированы два типа палинотератных почвенных комплексов (рис. 1А и 1Б). Каждый из них выглядит как «кладбище» стерильных форм с тремя экологически значимыми патологиями: каждое зерно одновременно и уродливо, и недоразвито, и имеет мелкий размер.

Комплекс Крюки (рис. 1А) с максимальным загрязнением ^{137}Cs выглядит как «кладбище» палиноморф с тремя экологически значимыми патологиями у каждой формы. Специфика комплекса — доминирование уродливых форм с чрезвычайно разнообразными патологиями, которые невозможно описать. Все они одновременно имеют мелкие размеры. Даже кажущиеся большими пыльцевые зерна хвойных (рис. 1А: 3,4) имеют максимальный размер 40 мкм, а у типичных зерен ~ 80 мкм [21]. Встречаются ультракарликовые формы < 5 мкм, например ольха (рис. 1А: 13) [22]. У многих зерен есть признаки недоразвития и эрозии (рис. 1А: 1–4).

Комплекс Масаны (рис. 1Б) с максимальным загрязнением $^{239/240}\text{Pu}$, ^{241}Am , и ^{90}Sr выглядит как «кладбище» палиноморф с тремя экологически значимыми патологиями. Его специфическая особенность — наличие большого количества форм с необычайно толстыми оболочками и высочайшая степень недоразвития форм, среди которых есть даже зерна, «пустые» внутри. Разнообразны уродства палиноморф. Есть пыльцевые зерна хвойных, у которых из-за огромного тела почти исчезли мешки (рис. 1Б: 1), или мешки асимметричны (рис. 1Б: 2), или есть лишь контуры пустого внутри зерна (рис. 1Б: 6). Присутствует ультракарликовые зерна: асимметричное зерно хвойного с максимальным диаметром ~ 30 мкм (рис. 1Б: 1).

В чернобыльском комплексе многие зерна не просто уродливы, а из-за многообразия отклонений от норм одновременно многих признаков — монстровидны. Рис. 2 иллюстрирует монстровидность пыльцы сосны из пунктов Крюки, Масаны и Лесок.

Среди всех полученных нами 65 СЭМ-микрографий только в пробе из Леска обнаружены два пыльцевых зерна с идеально развитой скульптурой и протопластом (два слипшихся зерна орешника). На рис. 2 (2, 6) наилучшее развитие скульптуры также зафиксировано в пробе из Леска, т. е. лес изредка защищал растения от радиации даже вблизи центра катастрофы.

Огромная статистика по палинотератным комплексам из экологически чистых отложений плейстоцена показывает, что в отличие от чернобыльских, для самых экстремальных природных климатофаз характерны комплексы с господством форм не с тремя, а лишь с двумя экологически значимыми патологиями: карликовость и недозрелость [19], так как в природных комплексах почти нет уродливой пыльцы. СЭМ изображение такого комплекса опубликовано для мустьерского слоя Баракаевской пещеры, со стыка степного и альпийского поясов (по фаунистическим данным) [14, 15]. Небольшое количество уродливой пыльцы в природных комплексах появляется лишь на границах ареалов, например, в современной лесотундре [17, с. 13].

В соответствии с критериями статистической палинотератной методики дифференциации геоботанических оптимумов и кризисов, СЭМ-микрографии «кладбищ» тератоморфных пыльцевых зерен из пунктов Крюки и Масаны с высочайшим радиоактивным загрязнением указывают на экстремальность экологической обстановки во время их формирования в 1986–1988 гг.

Для комплексов чернобыльского типа характерно:

- полное отсутствие морфологически типичных и нормально развитых форм (за исключением двух зерен на одной из 65 микрографий);
- много форм, неопределимых из-за уродливости и недоразвития: на рис. 1А и 1Б к пыльце отнесена 31 форма, а определены лишь 9 из них;
- все формы стерильны: отсутствие протопласта особенно четко иллюстрируют многочисленные эрозии на пыльцевых зернах (рис. 1А: 3, 4; рис. 1Б: 4, 6, 8, 12; рис. 2: 1, 5);
- у многих форм отсутствуют различные морфологические признаки, есть даже формы, «пустые» внутри (рис. 1А: 1–4; 1Б: 6, 12);
- только в чернобыльских комплексах резко доминируют монстровидные формы с многообразными отклонениями любых признаков от палиноморфологических норм (рис. 2);

– размеры варьируют от мелких до ультракарликовых: пыльца сосны (рис. 1А: 3, 4) меньше эталонов; зерно ольхи < 5 мкм (рис. 1А: 13), а минимальные размеры ее эталонных форм — минимум 14 мкм [22].

В настоящее время из 65 СЭМ-микрографий, полученных для чернобыльского комплекса, опубликованы лишь три. Их подробное описание впервые приведено в данной статье. Они позволили сделать открытие: выявлено наличие двух типов палинотератных комплексов в зависимости от преобладающих радиоактивных загрязнителей — комплекс Крюки (рис. 1А) с максимумом ^{137}Cs и Масаны (рис. 1Б) с максимумом $^{239/240}\text{Pu}$, ^{241}Am , и ^{90}Sr .

Необходимо продолжение СЭМ-исследований отложений для мониторинга изменений в палинотератных комплексах спустя 37 лет после Чернобыльской катастрофы и создание атласа СЭМ-микрографий с «кладбищами» тератоморфной пыльцы из отложений с высоким уровнем радиоактивного заражения.

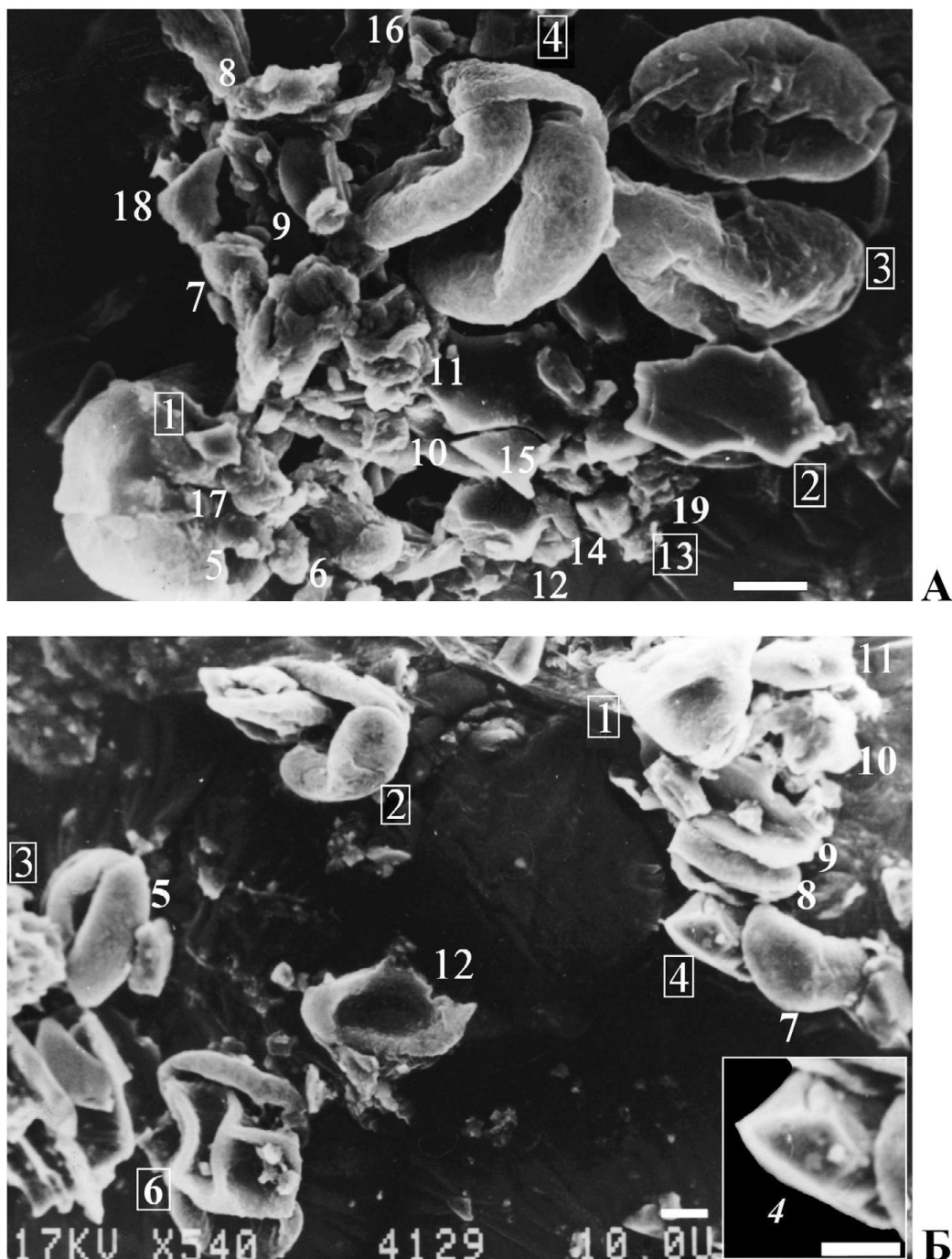


Рис. 1. Комплексы Крюки (А) и Масаны (Б) — «кладбища» морфологически атипичных пыльцевых зерен из поверхностных почвенных проб, отобранных вблизи ЧАЭС в 1988 г. СЭМ ($\times 540$). А: 1 — береза; 2, 13 — ольха; 3, 4 — сосна; 5, 6, 8–12, 14–19 — неопределимые формы; Б: 1, 2, 6 — хвойные; 3 — астровые; 4 — березовые; 5, 7–12 — неопределимые формы

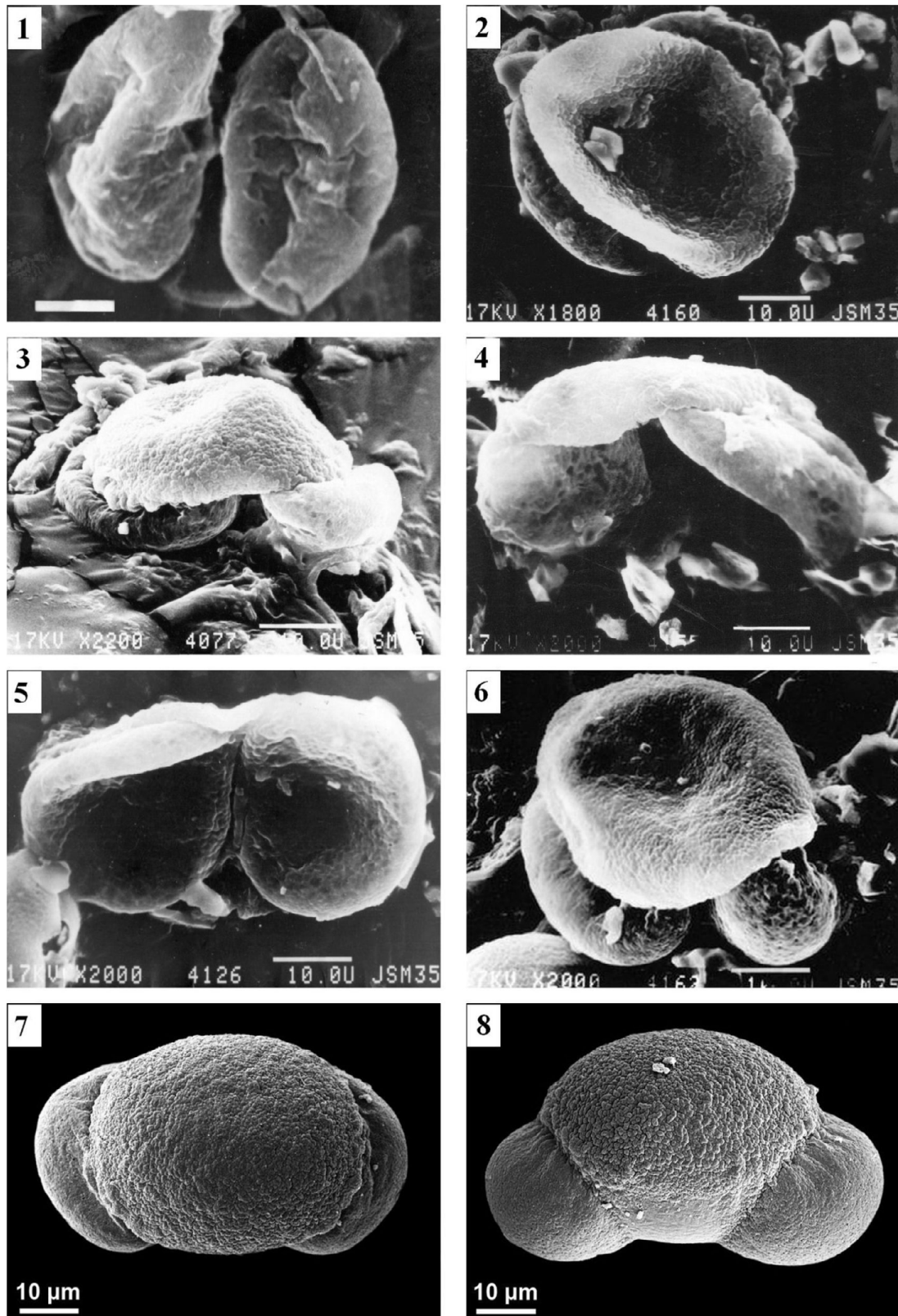


Рис. 2. Сравнение современных морфологически типичных пыльцевых зерен сосны обыкновенной (7, 8 [23]) с черновильскими уродливыми зёрнами сосны из поверхностных проб, отобранных в 1988 г. из пунктов: Крюки (1), Лесок (2, 4, 6), Масаны (3, 5). СЭМ. Пыльцевые зёрна: 1, 2, 7 — вид с полюса; 3–6, 8 — вид с экватора

Литература

1. Глазун И. Н. Репродуктивная способность хвойных растений при хроническом облучении ионизирующей радиацией в зоне отчуждения ЧАЭС на территории Брянской области // Актуальные проблемы лесного комплекса. 2006. № 13. С. 147–150.

2. Макаренко Е. С., Удалова А. А., Волкова Ю. П. Морфологические показатели и генетические изменения, наблюдаемые в хронически облучаемых популяциях растений // IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений — основа создания растений будущего». Казань. 2019. С. 271.
3. Дзюба О. Ф. Тератоморфные пыльцевые зерна в современных и палеопалинологических спектрах и некоторые проблемы палинотратиграфии // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2007. Т. 2.
4. Пожидаев А. Е. Естественный полиморфизм в расположении апертур пыльцы цветковых растений // Материалы I Международ. Семинара «Пыльца как индикатор состояния окружающей среды и палеогеографические реконструкции» СПб.: ВНИГРИ, 2001. С. 141–144.
5. Сиренко Е. А. Палинологические данные к исследованию донных отложений водоемов 30-километровой зоны Чернобыльской АЭС // Пыльца как индикатор состояния окружающей среды и палеоэкологические реконструкции: Международный семинар. СПб.: ВНИГРИ, 2001. С. 190.
6. Левковская Г. М., Брицкий Д. А., Четверова В. А., Газизова Д. Г. Палинотератная статистика отложений как источник информации об оптимальных, стрессовых или катастрофических состояниях растительности прошлого и настоящего // Методы палеоэкологических исследований. Тезисы докладов палинологической школы-конференции. М.: МГУ, 2014. С. 42.
7. Левковская Г. М., Каспаров А. К., Боголюбова А. Н. Дифференциация геоботанических кризисов прошлого и настоящего на основе палинотератной статистики // Актуальные проблемы современной палинологии: Материалы XV Всерос. палинол. конф. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, ГЕОС, 2022. С. 201–205.
8. Levkovskaya G. Palynoteral complexes as indicators of the ecological stress, past and present // Proceedings of the 5th European Palaeobotanical and Palynological Conference (Kraków, June 26–30, 1998). Acta Palaeobotanica. International Journal of Palaeobotany and Palynology. Suppl. 2. 1999. P. 643–648.
9. Левковская Г. М., Шамаль Н. В., Орехова М. Г., Брицкий Д. А., Мацко В. П., Сквернюк И. И. Типы палинотератных комплексов отложений из 30-километровой зоны Чернобыля и плейстоценовых климатических экстремумов // Чернобыль: 30 лет спустя. Материалы международной конференции. Гомель. 2016. С. 135–140.
10. Левковская Галина Михайловна // Палинологи России: биогр.-библиогр. справочник / Сост. М. В. Ошуркова. СПб.: ВСЕГЕИ, 2013. С. 205–212.
11. Левковская Г. М., Болиховская Н. С., Лисицын С. Н. и др. Отражение глобального кризиса, вызванного изменением циркуляции озона в атмосфере из-за смены геомагнитных полюсов около 42 т. л. н. в пойменном («Костенки-12») и водораздельном (Стрелица) рефугиумах из бассейна Верхнего Дона // Актуальные проблемы современной палинологии: Материалы XV Всерос. палинол. конф. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, ГЕОС. 2022. С. 196–200.
12. Левковская Г. М., Хоффекер Дж. Ф., Аникович М. В. и др. Климатостратиграфия древнейших палеолитических слоев стоянки «Костенки-12» — Волковская (палинологические, палинотератные, фаунистические, палеопедологические, палеомагнитные и СЭМ-палеоботанические данные) // Проблемы ранней поры верхнего палеолита Костенковско-Борщевского района и сопредельных территорий. Труды Костенковско-Борщевской археологической экспедиции. Вып. 3. СПб.: ИИМК РАН, 2005. С. 93–130.
13. Levkovskaya G. M., Shumilovskikh L. S., Anikovich M. V. et al. Supra-regional correlations of the most ancient paleosols and Paleolithic layers of Kostenki – Borschevo region (Russian Plain) // Quaternary International. 2015. Vol. 365. P. 114–134.
14. Левковская Г. М. Новые данные о природной среде и собирательстве неандертальцев из Баракаевской пещеры. (Северный Кавказ) // Исследования первобытной археологии Евразии. Махачкала. 2010. С. 208–239.
15. Levkovskaya G. M., Shamal N. V., Baryshnikov G. F., Bogolyubova A. N. Types of palynoteral responses of the plants reproductive sphere to the Chernobyl accident and natural climatic extrema of the Neanderthal epoch // Динамика экосистем в голоцене. Мат. Всерос. конф. 2022. СПб. С. 431–437.
16. Левковская Г. М. Зональные и локальные особенности палинокомплексов современных отложений из Южной Аравии // Актуальные проблемы современной палинологии. Мат. XIV палинол. конф. 2017. М.: МГУ. С. 154–157.
17. Левковская Г. М. Зональные особенности современной растительности и рецентных спорово-пыльцевых спектров Западной Сибири // Методические вопросы палинологии. Тр. III Междунар. палинол. конф. М. 1973. С. 116–120.
18. Cooper A., Turney C. S. M., Palmer J. et al. A global environmental crisis 42,000 years ago. // Science. 2021. Vol. 371, № 6531. P. 811–818.
19. Ананова Е. А. О недоразвитой пыльце в ледниковых отложениях // Бюлл. комиссии по изучению четвертичного периода. М.: Наука. 1966. С. 18–22.
20. Левковская Г. М., Тарасевич В. Ф., Шамаль Н. В., Каспаров А. К., Боголюбова А. Н. Обнаружение специфики воздействия на репродуктивную сферу растений высочайших доз цезия или плутония-америция-стронция (СЭМ-палинотератные данные поверхностных почвенных проб 1988 г. из 30-километровой зоны Чернобыля) // Сборник научных трудов. VII Съезд Биофизиков России. Т. 2. Краснодар. 2023. С. 349–350.
21. Бобров А. Е., Куприянова Л. А., Литвинцева М. В., Тарасевич В. Ф. Споры папоротникообразных и пыльца голосеменных и однодольных растений флоры Европейской части СССР. Л.: Наука, 1983. 208 с.
22. Куприянова Л. А., Алешина Л. А. Пыльца и споры растений флоры Европейской части СССР. Т. 1. Л.: Наука. 1972. С. 63.
23. Halbritter H., Heigl H., Auer W. 2021. *Pinus sylvestris*. In: PalDat — A palynological database. URL: https://www.paldat.org/pub/Pinus_sylvestris/306147;jsessionid=1ACA4E3979E0856EAF50A1E935EACC6.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-193

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙ
ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ****THE USE OF BACTERIAL MOTILITY CHARACTERISTICS
FOR RAPID ASSESSMENT OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY**В. В. Литвиненко¹, Е. В. Васильева¹, М. А. Абдулкадиева^{1,2}, Е. В. Сысолятина², С. А. Ермолаева²¹Объединенный институт высоких температур РАН, Москва²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, МоскваV. V. Litvinenko¹, E. V. Vasilieva¹, M. A. Abdulkadieva^{1,2}, E. V. Sysolyatina², S. A. Ermolaeva²¹Joint Institute of High Temperatures RAS, Moscow²Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ veronichkall.2003@yandex.ru

Аннотация

Подвижные бактерии способны преобразовывать химическую энергию в направленное движение. Характеристики подвижности (траектории, средние скорости, среднее время нахождения в слое и т. д.) зависят от морфологии бактериальной клетки (количества и расположения жгутиков), наличия химических стимулов в среде, удаленности от поверхности, концентрации бактерий. Параметры изменения подвижности могут быть использованы как прогностический признак нарушения метаболизма бактериальной клетки.

Abstract

Motile bacteria are capable of converting chemical energy into directed movement. The characteristics of motility (trajectories, average speeds, average time spent in a layer, etc.) depend on the morphology of the bacterial cell (number and arrangement of flagella), the presence of chemical stimuli in the environment, distance from the surface, and bacterial concentration. Changes in motility parameters can be used as a prognostic indicator of bacterial cell metabolism disorders.

Цель работы — отбор параметров, характеризующих подвижность бактерий, для быстрой оценки их устойчивости к антибиотикам или другим типам воздействий.

Материалы и методы

Траектории приповерхностного движения реконструировали по видеоизображениям бактериальной суспензии в микрофлюидической камере [1]. Охарактеризовывали движение бактерий путем построения плотностей вероятностей скорости движения в приповерхностном слое. Для этого полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Plasma 4.0, в результате чего получали координаты местоположения каждой бактерии на каждом кадре. Далее мгновенные скорости для каждой бактерии рассчитывались по формуле:

$$V_x(t) = (x(t+1) - x(t)) \cdot fps; V_y(t) = (y(t+1) - y(t)) \cdot fps; V(t) = \sqrt{V_x(t)^2 + V_y(t)^2},$$

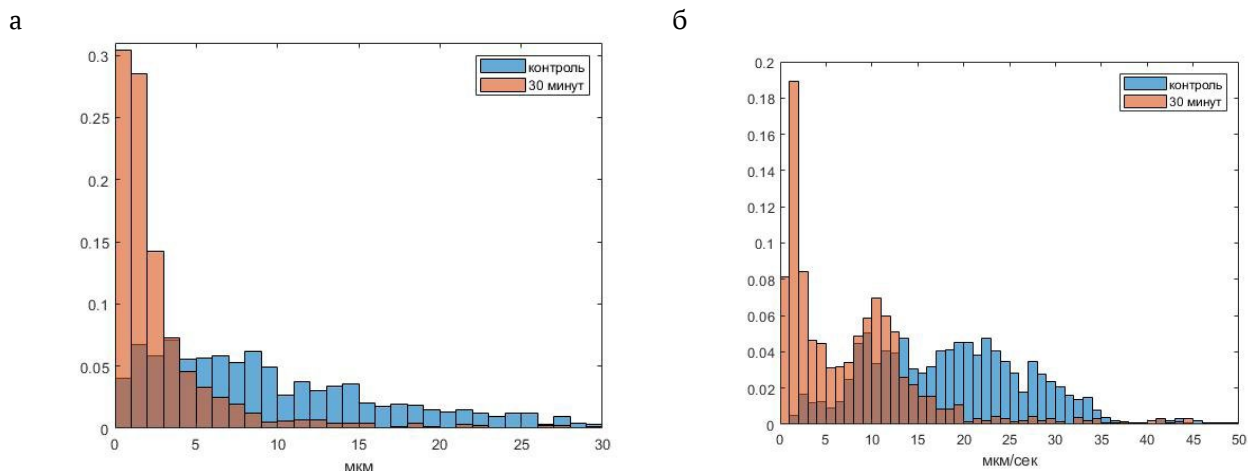
где $V_x(t)$ — мгновенное значение скорости в момент времени t по координате x , $V_y(t)$ — мгновенное значение скорости в момент времени t по координате y , $x(t)$, $x(t+1)$ — координаты по оси абсцисс в момент времени t и $t+1$, $y(t)$, $y(t+1)$ — координаты по оси ординат в момент времени t и $t+1$, fps (frames per second) — количество кадров в секунду.

Характерная длина траектории рассчитывалась как большая диагональ многоугольника, в который вписана распознанная траектория движения бактерии.

В работе использовали подвижный штамм *L. monocytogenes* EGDe, инкубируемый при 22 °С. Бактериальную суспензию разводили до значений оптической плотности $OD_{600} = 1$ свежей средой. Добавляли гентамицин в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали бактериальную суспензию в течение 30 мин при 22 °С. В качестве контроля использовали образец без добавления антибиотика.

Результаты

Было установлено, что инкубация с гентамицином приводила к снижению средней скорости движения листерий с 20 до 10 мкм/с и к смещению средней длины траекторий с 12 до 3 мкм (см. рисунок).



Распределение скоростей движения (а) и длин траекторий (б) *L. monocytogenes* в присутствии антибиотика гентамицина

Таким образом, были получены данные, характеризующие распределения скоростей бактерий, их траектории и время нахождения в слое жидкости. Было установлено, что наиболее информативным показателем, на котором может быть основан анализ антибиотикочувствительности, является форма профиля скоростей движения бактерий, что было продемонстрировано на модели изменения подвижности листерий при инкубации в растворе с гентамицином.

Литература

1. Abdulkadieva M. M. et. al. Strain specific motility patterns and surface adhesion of virulent and probiotic *Escherichia coli*. // Sci. Rep. 2022. Vol. 12 (1). P. 61412.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-194

СОЗДАЕМ «ПОРТРЕТЫ» БЕЛКОВ МЕТОДАМИ ПРОИЗВОДНОЙ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ
(НА ПРИМЕРЕ ГЕМОЦИАНИНА МОЛЛЮСКА *ACHATINA FULICA*
И БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА)

“PORTRAYING” PROTEINS BY DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRY (CASE STUDY
HEMOCYANIN FROM THE MOLLUSK *ACHATINA FULICA* AND BOVINE SERUM ALBUMIN)

Н. М. Малыгина^{1,2}, А. Ю. Лянгузов¹, А. М. Иванов², Т. А. Петрова¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет

²Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

N. M. Malygina^{1,2}, A. Yu. Lianguzov¹, A. M. Ivanov², T. A. Petrova¹

¹Saint Petersburg State University

²Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg

✉ n.malygina@spbu.ru

Аннотация

На примере двух белков: гемоцианина моллюска *A. fulica* и БСА, показано, как использование четвертых производных УФ-спектров поглощения позволяет выявить индивидуальные особенности белков, связанные с наличием в их составе ароматических аминокислот. Для реализации метода разработан скрипт на свободном языке программирования R. Такой подход может оказаться полезным при решении самых разных задач.

Abstract

Two proteins, hemocyanin from the mollusk *A. fulica* and BSA, were used to show how the fourth derivatives of UV absorption spectra make it possible to reveal individual proteins characteristics associated with the presence of aromatic amino acids in their composition. To implement the method, the script was developed in the R programming language. This approach can be helpful in solving a variety of problems.

Поглощение света белками в УФ-зоне обусловлено наличием в их составе ароматических аминокислот Phe, Tyr и Trp с максимумами поглощения при 257, 274 и 280 нм соответственно [1]. На исходных спектрах белков полосы Tyr и Trp частично перекрываются, а Phe почти незаметен из-за низкого значения молярного коэффициента его поглощения. В итоге на графиках наблюдается лишь суммарный широкий пик, поэтому спектры практически любых растворимых белков в области 240–300 нм очень похожи друг на друга, несмотря на различия в аминокислотном составе (см. рисунок, А).

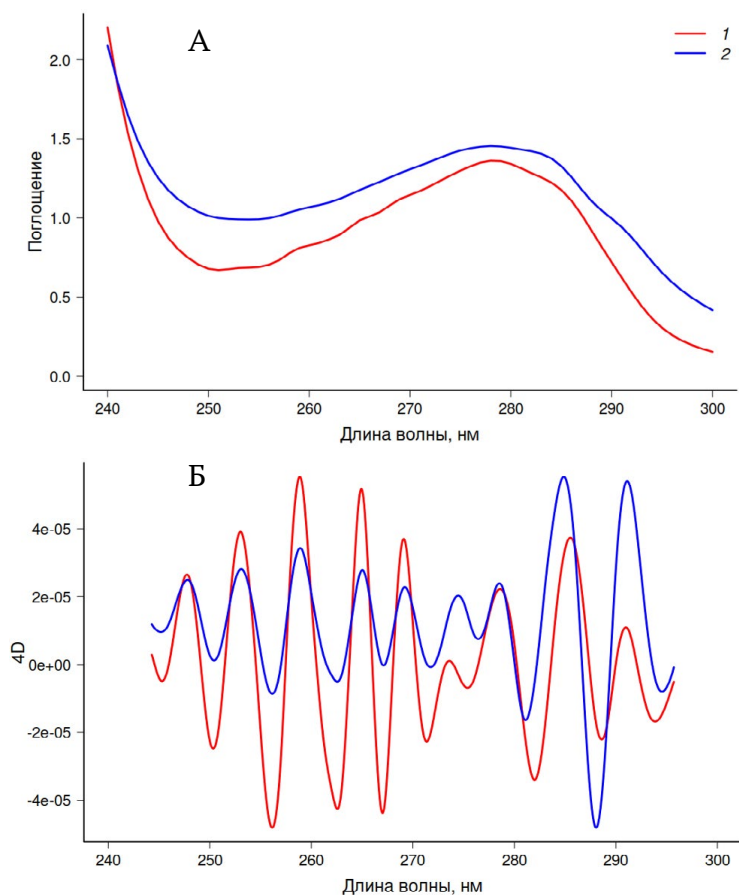
Методы производной спектрофотометрии позволяют выделить отдельные полосы хромофоров в исходных спектрах [2]. Однако в доступной нам литературе мы нашли лишь несколько работ, где для исследования белков применялась именно производная спектрофотометрия, причем авторы ограничивались расчетами только вторых производных, сообщая, что использование четвертых производных было бы более эффективным [3].

Цель работы — на примере гемоцианина (Гц) моллюска *A. fulica* и БСА разработать быстрый неразрушающий способ анализа нативных белков методами производной УФ-спектрофотометрии по четвертым производным спектров.

Гц ахадины — сложно устроенный белок с молекулярной массой 9 млн Да [4], широко употребляемые методы непригодны для работы с ним. БСА, белок с известной аминокислотной последовательностью [5], и набор свободных ароматических аминокислот использованы как стандарты.

Основные этапы выполнения анализа: запись спектров поглощения свободных ароматических аминокислот и белков в области 240–300 нм на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35; сглаживание паразитных шумов с использованием функции `spline`; расчет четвертых производных спектров методом численного дифференцирования и расчет коэффициентов корреляции четвертых производных [6]. Для обработки данных и представления результатов нами был разработан скрипт на открытом языке программирования R [7].

* Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка СПбГУ.



Сравнение УФ-спектров поглощения Гц *A. fulica* и БСА (А) и их четвертых производных (Б). 1 — БСА, 2 — Гц

Для верификации метода реконструировали четвертую производную спектра поглощения БСА путем комбинации четвертых производных спектров свободных ароматических аминокислот и получили хорошее совпадение с четвертой производной спектра нативного белка.

Далее сравнили четвертые производные спектров поглощения Гц и БСА (см. рисунок, Б). На графиках четвертых производных слева наблюдается четко выраженная «гребенка» из пяти полос, обусловленная наличием в структуре белков Phe, направо от нее расположены частично перекрывающиеся полосы Trp и Tyr. В результате обнаружены существенные расхождения спектральных характеристик белков в широкой УФ-зоне 240–300 нм. В подвижной частично слившейся зоне поглощения Trp и Tyr различия также хорошо заметны, а область поглощения Phe более стабильна. Коэффициенты корреляции составили 0,64 (зона 240–300 нм), 0,98 (зона Phe) и 0,61 (зона Trp–Tyr) [6].

Выводы

Разработан быстрый неразрушающий способ анализа нативных белков методами производной УФ-спектрофотометрии. Установлено, что профиль четвертой производной является объективной индивидуальной характеристикой белка. В результате предложенный подход позволяет предста-

вить спектральный «портрет» белка, отличающий его от других белков, который затем можно использовать как стандарт при экспериментальной работе.

Литература

1. Boysen R. I., Hearn M. T. W. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, vol. 5: Analysis and Function of Amino Acids and Peptides. Wiley-VCH, 2012. 508 p.
2. Talsky G. Derivative spectrophotometry. Wiley, John & Sons, 1994. 228 p.
3. Ojeda C. B., Rojas F. S. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2009–2011: a review // Microchem. J. 2013. Vol. 106. P. 1–16.
4. Van Holde K. E., Miller K. I., Decker H. Hemocyanins and invertebrate evolution // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 15563–15566.
5. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023 // Nucleic Acids Res. 2023. Vol. 51. P. D523–D531.
6. Lianguzov A. Y., Malygina N. M., Ivanov A. M., Petrova T. A. On particular regimens of derivative UV spectrophotometry for comparative analysis of proteins // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. Vol. 58. Suppl. 1. P. S153–S159.
7. R Project. Reference date: 06.07.2023. URL: <http://cran.r-project.org>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-195

**НАНОЧАСТИЦЫ $\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ТЕРАНОСТИЧЕСКИЙ АГЕНТ
ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ** **$\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ NANOPARTICLES AS NEW THERANOSTIC AGENT FOR RADIATION THERAPY**Е. А. Мысина¹, В. К. Иванов², Д. Д. Колманович¹, А. Л. Попов¹¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино*²*Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва*E.A. Mysina¹, V.K. Ivanov², D.D. Kolmanovich¹, A. L. Popov¹¹*Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino*²*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ antonpopovleonid@gmail.com

Аннотация

В качестве перспективного тераностического агента нами предложен новый тип нанорадиосенсибилизатора на основе наночастиц фторида лютеция, допированных гадолинием, которые обладают радиосенсибилизирующей активностью и МРТ-визуализацией по T1.

Abstract

Here, we have proposed a new type of lutetium fluoride based nanoradiosensitizer based, which have radiosensitizing activity and T1 MRI imaging.

Одним из наиболее перспективных способов повышения эффективности терапевтического действия лучевой терапии является использование селективных радиосенсибилизаторов — веществ, способных эффективно накапливаться в опухоли и, взаимодействуя с излучением, индуцировать повреждение ДНК и окислительный стресс, приводя к гибели опухолевых клеток. В качестве такого агента-нанорадиосенсибилизатора нами предложены наночастицы фторида лютеция, допированные гадолинием, что обеспечивает дополнительную возможность их МРТ-визуализации по T1. Наночастицы синтезированы гидротермально-волновым методом при 160 °C в течение 24 ч. В результате такой обработки был получен белый осадок, который отделяли центрифугированием (20000 об./мин, 5 мин), трижды промывали дистиллированной водой и суспендировали в растворе цитрата аммония в качестве стабилизатора (молярное соотношение фторид РЗЭ — стабилизатор = 1:1). Гидродинамический радиус наночастиц $\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ при разведении в воде составил 122 ± 7 нм, дзета-потенциал -20 ± 1 мВ, время продольной релаксации по T1 $5,5 \pm 0,13$ мс, что превышает значение некоторых используемых в клинике МРТ контрастирующих агентов.

Был проведен анализ редокс-активности наночастиц $\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ путем детекции уровня пероксида водорода в системе йод-фенол пероксидаза хрена после облучения суспензии наночастиц рентгеновским излучением. Показано, что наночастицы $\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ проявили прооксидантную активность после облучения рентгеновским излучением, увеличивая уровень пероксида водорода до 120 и 140 нМ для 0,1 и 0,5 мМ соответственно.

Анализ биосовместимости и цитотоксичности наночастиц $\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ проводили методом МТТ-теста на культурах клеток В16F10, ЕМТ6/Р, МNNG/HOS, МCF-7, NCTC L929. Было выявлено дозозависимое снижение метаболической активности клеток при концентрациях наночастиц выше 0,5 мМ. Таким образом, можно сделать вывод о перспективности использования цитрат-стабилизированных наночастиц $\text{Lu}_{0,85}\text{Gd}_{0,15}\text{F}_3$ в качестве нанорадиосенсибилизатора в условия воздействия рентгеновского излучения.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-73-10231.

© Е. А. Мысина, В. К. Иванов, Д. Д. Колманович, А. Л. Попов, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-196

**СТРУКТУРНЫЕ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕМАТИКА,
ДОПИРОВАННОГО РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПИГМЕНТАМИ****THE STRUCTURAL AND OPTICAL PROPERTIES OF NEMATIC DOPED WITH PLANT PIGMENTS**Ю. В. Навесова^{1,2}, М. Н. Крахалев^{1,2}, Т. А. Зотина^{1,3}¹Сибирский федеральный университет, Красноярск²Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН, Красноярск³Институт биофизики СО РАН, КрасноярскYu. V. Navesova^{1,2}, M. N. Krakhalev^{1,2}, T. A. Zotina^{1,3}¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk²Kirensky Institute of Physics SB RAS, Krasnoyarsk³Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

✉navesova7@gmail.com

Аннотация

Исследовано взаимодействие комплекса фотосинтетических пигментов роголистника с нематическим жидким кристаллом ЛН-396. Обнаружено, что набор пигментов индуцирует закрутку структуры нематика. Значение закручивающей силы составило $\beta = -2,84 \text{ мкм}^{-1}$. Исследование показало, что жидкий кристалл ориентирует молекулы пигмента и они проявляют линейный дихроизм поглощения с экстремумом в спектральном диапазоне 400–520 нм.

Abstract

The interaction between the complex of photosynthetic pigments from hornwort and the nematic liquid crystal LN-396 was investigated. It was found that a set of pigments induces twist in the nematic structure, with a helical twisting power of $\beta = -2,84 \text{ }\mu\text{m}^{-1}$. The study demonstrated that the liquid crystal orients the pigment molecules, which exhibited linear absorption dichroism with an extremum in the spectral range of 400–520 nm.

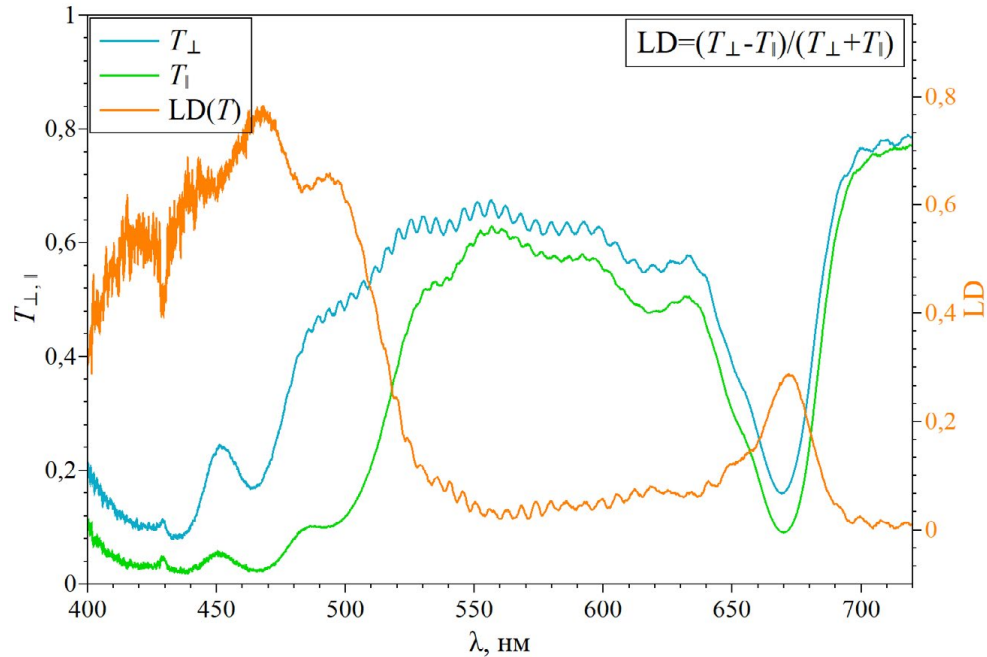
Жидкие кристаллы (ЖК) проявляют высокую чувствительность к энантиомерам, растворенным в них. Например, допирование нематика даже небольшим количеством хиральных молекул преобразуют его в холестерик. Благодаря эффекту можно изучать свойства добавленного в ЖК вещества: конформацию молекул, оптическую активность, закручивающую способность и пр. С другой стороны, для ЖК систем известен эффект хозяин – гость, при котором структура ЖК позволяет выявить анизотропию свойств растворенного вещества или расширить их функциональные возможности [1]. Это делает ЖК перспективными средами для хемо- и биосенсоров, а также для разработки экологических оптических материалов.

Например, использование смеси холестерика с хлорофиллом, выделенным из растения, позволило создать переключаемые чернила для защиты от подделок: при дневном освещении холестерик, благодаря селективному отражению света, формирует цветное изображение, в то время как в ультрафиолетовом свете проявляется защитная информация вследствие фотолюминесценции хлорофилла [2]. Для разработки таких материалов необходимо отдельно исследовать вопрос взаимного влияния добавки и ЖК, а также стабильность системы. В частности, известно, что фотосинтетические пигменты обладают оптической активностью, как, например, хлорофилл *a* [3], и, как следствие, потенциально могут вносить свой вклад в закрутку структуры холестерика. В данной работе исследована система на основе нематического жидкого кристалла и комплекса растительных пигментов, полученных из роголистника.

Для исследования из воздушно-сухой биомассы высшего водного растения роголистника погруженного (*Ceratophyllum demersum* L.) был получен ацетоновый экстракт комплекса фотосинтетических пигментов в концентрациях хлорофилла *a* – 402 мкг/мл, хлорофилла *b* – 157 мкг/мл, каротиноидов – 124 мкг/мл. Экстракт смешивался с нематиком ЛН-396, и далее ацетон полностью испарялся при температуре 60 °С. Исследовались образцы с несколькими концентрациями растительных пигментов в ЖК. Структурные и оптические свойства полученных смесей нематиков изучались в ЖК ячейках, состоящих из стеклянных подложек с ПТО покрытием и ориентирующими полимерными пленками. В качестве ориентанта на одну подложку наносилась пленка поливинилового спирта (ПВС) с последующим однонаправленным натиранием. На вторую подложку наносилась пленка поли(-

терт-бутилметакрилата) (ПтБМА). Для ЖК ЛН-396 натертая пленка ПВС задает однородные планарные граничные условия, пленка ПтБМА формирует азимутально вырожденное планарное сцепление. Исследования проводились при помощи поляризационного оптического микроскопа и спектральными методами.

Было обнаружено, что добавка пигментов приводит к появлению закрутки нематика ЛН-396. Была измерена закручивающая сила пигментов, которая получилась равной $\beta = -2,84 \text{ мкм}^{-1}$. Спектры поглощения образцов, снятые в поляризованном свете, обнаружили наличие линейного дихроизма пигментов в диапазоне 400–520 нм с максимальным значением $LD = 0,83$ на длине волны 466 нм (см. рисунок).



Спектры пропускания ЖК ячейки света, поляризованного перпендикулярно (T_{\perp}) и параллельно (T_{\parallel}) направлению натирки пленки ПВС **R**, LD — линейный дихроизм

Литература

1. Solladie G., Zimmermann R.G. Liquid Crystals: A Tool for Studies on Chirality // *Angewandte Chemie*. 1984. Vol. 23. P. 348–362.
2. Gollapelli B., Ganji S.R. R., Tatipamula A.K. et al. Bio-derived chlorophyll dye doped cholesteric liquid crystal films and microdroplets for advanced anti-counterfeiting security labels // *Journal of Molecular Liquids*. 2022. Vol. 363 P. 119952.
3. Houssier C., Sauer K. Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments // *Journal of the American Chemical Society*. 1970. Vol. 76 (4). P. 779–791.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-197

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ТРОПОНИНОВОГО КОМПЛЕКСА И ТРОПОМИОЗИНА*****MOLECULAR MECHANISMS OF TROPONIN COMPLEX
AND TROPOMYOSIN INTERACTION**В. В. Нефедова¹, О. И. Кечко², А. М. Матюшенко¹, Д. И. Левицкий¹¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, МоскваV. V. Nefedova¹, O. I. Kechko², A. M. Matyushenko¹, D. I. Levitsky¹¹Research Center of Biotechnology RAS, Moscow²Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ victoria.v.nefedova@mail.ru

Аннотация

Исследования молекулярных механизмов мышечного сокращения снова становятся чрезвычайно актуальными. Основой такого рода исследований является установление детального механизма молекулярных перестроек в тропонин-тропомиозиновой системе, лежащей в основе регуляции сокращения мышц в норме и патологии. Целью данной работы было установление параметров взаимодействия между тропонином и тропомиозином и механизма сборки этого комплекса.

Abstract

Studies of the molecular mechanisms of muscle contraction are again becoming extremely relevant. The cornerstone of this kind of research is the establishment of a detailed mechanism of molecular rearrangements in the troponin-tropomyosin system underlying the regulation of muscle contraction in norm and pathology. The aim of this work was to establish the parameters of the interaction between troponin and tropomyosin and the assembly mechanism of this complex.

Мышечное сокращение является результатом последовательных, четко детерминированных во времени и пространстве перестроек в сложных белковых комплексах, формирующих миофибриллы. Глобально процесс может быть разделен на 2 больших этапа: запуск мышечного сокращения, который определяется перестройками в регуляторных белках, и собственно сокращения, осуществляемого с помощью движения тонких (актиновых) нитей относительно толстых (миозиновых). К основным регуляторным белкам относят тропомиозин (Трп) и тропониновый комплекс (Тп). Тп комплекс связывает ионы кальция, тем самым запуская молекулярные перестройки как внутри себя, так и на поверхности актинового филамента. Тп представляет собой гетеро-олигомерный белок, состоящий из 3 субъединиц: ТпТ, ТпI и ТпС, взаимодействующих между собой в эквимольном соотношении. ТпС отвечает за связывание кальция, ТпI блокирует перемещение Трп по поверхности актинового филамента в отсутствие Ca^{2+} , а ТпТ взаимодействует с тропомиозином и способствует формированию правильной тропонин-тропомиозиновой системы. В своей работе мы сосредоточились на изучении взаимодействия ТпТ с тропомиозином. Нашей целью стало изучение механизма взаимодействия Трп и Тп в зоне перекрытия димеров Трп. Этот участок очень важен, так как благодаря взаимодействиям в этом месте формируется длинный и протяженный тяж тропомиозина, формирующий единую регуляторную систему вдоль всей поверхности актинового филамента.

Для экспериментов был использован рекомбинантный укороченный фрагмент ТпТ1 человеческой сердечной изоформы ТпТ, содержащий 1–158 а. к. В первую очередь было изучено связывание ТпТ1 с Трп методом вискозиметрии. Формирование взаимодействий между этими белками приводило к увеличению вязкости раствора Трп в 8 раз, с $0,125 \pm 0,001$ мПа·с до $0,992 \pm 0,001$ мПа·с, что указывает на стабилизацию взаимодействия N- и C-концов Трп посредством формирования дополнительных контактов с ТпТ1. Для определения термодинамических параметров взаимодействия ТпТ1 с Трп был использован метод изотермической калориметрии титрования (ИТС). Константа диссоциации K_D для связывания ТпТ1 с Трп составила $0,91 \pm 0,14$ мкМ. Поскольку ТпТ1 фрагмент связывает перекрывающееся соединение N- и C-концов Трп, для определения констант связывания с каждым из этих доменов были получены два фрагмента Трп: N-концевой (Трп WT₁₋₁₃₃) и C-концевой (Трп

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-1772.2022.1.4.

WT₁₃₄₋₂₈₄). Благодаря использованию укороченных белков мы исключили полимеризацию Трм, но не образование зоны перекрытия между N- и C-концами Трм.

Для смеси Трм WT₁₋₁₃₃, Трм WT₁₃₄₋₂₈₄ и ТнТ1 была определена константа диссоциации K_D , равная $0,90 \pm 0,15$ мкМ, что соответствовало K_D взаимодействия ТнТ1 с целым Трм. При этом изолированный Трм WT₁₋₁₃₃ не взаимодействовал с ТнТ1, в то время как изолированный Трм WT₁₃₄₋₂₈₄ взаимодействовал с константой K_D , равной $1,9 \pm 0,5$ мкМ. Это указывает на то, что первичное связывание между Трм и ТнТ происходит по С-концу Трм. Константа взаимодействия двух концов Трм между собой составила $10,2 \pm 0,3$ мкМ. Преобразованный комплекс ТнТ1/ТрмWT₁₃₄₋₂₈₄ взаимодействовал с Трм WT₁₋₁₃₃ с константой $1,7 \pm 0,4$ мкМ. Полученные результаты позволяют установить вероятный молекулярный механизм взаимодействия Трм с ТнТ. Вначале происходит связывание ТнТ1 с С-концевым участком Трм с образованием двойного комплекса, после чего этот комплекс связывается с N-концевым участком Трм и формируется полный тройной комплекс, обладающий функциональной физиологической активностью.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-198

**ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ
МЯГКОГО КОРАЛЛА *RENILLA MUELLERI*****THE THERMOSTABILITY ENHANCEMENT OF *RENILLA MUELLERI* RECOMBINANT LUCIFERASE**Ш. А. Нур^{1,2}, М. Д. Ларионова², Л. П. Буракова^{1,2}, Е. В. Еремеева^{1,2}¹Сибирский федеральный университет, Красноярск²Институт биофизики СО РАН, КрасноярскS.A. Nur^{1,2}, M.D. Larionova², L.P. Burakova^{1,2}, E.V. Eremeeva^{1,2}¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk²Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

✉ noorshel@mail.ru

Аннотация

Использование люциферазы в качестве биолюминесцентных меток часто осложняется значительным снижением ферментативной активности при физиологических температурах. Для увеличения термостабильности люциферазы RmY вносили ряд аминокислотных замен в соответствующую генетическую конструкцию методом сайт-направленного мутагенеза. Показано, что термостабильность люциферазы RmY увеличилась в ответ на внесение выбранных аминокислотных замен.

Abstract

The use of luciferase as bioluminescent markers is often complicated by a significant decrease in enzymatic activity at physiological temperatures. To increase the thermal stability of RmY luciferase, a number of amino acid substitutions were introduced into the corresponding genetic construct by site-directed mutagenesis. The thermal stability of RmY luciferase was shown to increase in response to the introduction of selected amino acid substitutions.

В настоящее время люциферазы широко используются в качестве биолюминесцентных меток в различных методах диагностики *in vivo* и *in vitro*, но использование люциферазы часто осложняется значительным снижением ферментативной активности при физиологических температурах.

Люцифераза мягкого коралла рода *Renilla* клонирована одной из первых [1] и остается пока единственной клонированной внутриклеточной целентеразин-зависимой люциферазой. Она представляет из себя односубъединичный белок, состоящий из 311 аминокислот [2]. Последовательная замена 7 аминокислот в люциферазе коралла *Renilla muelleri* позволила получить термостабильный вариант белка Rm7, послуживший основой для создания множества мутантных и гибридных белков. Чтобы получить термостабильный вариант люциферазы Rm7, были произведены следующие аминокислотные замены: A55T, C124A, C130A, A143M, M185V, M253L, S287L [3]. Rm7 демонстрирует существенно бóльшую устойчивость к инактивации при 37 °С и почти в 1,5 раза бóльшую активность по сравнению с нативной RmLuc [2].

Для увеличения термостабильности люциферазы RmY, мутантного варианта люциферазы Rm7 со смещенным в длинноволновую область максимумом спектра биолюминесценции, вносили ряд аминокислотных замен в генетическую конструкцию pDEST566-His6-MBP-RmY, содержащую полигистидиновую последовательность для аффинной очистки белка, целевой ген RmY и ген мальтоза-связывающего белка (MBP), повышающего растворимость люциферазы в цитоплазме клеток. Необходимые замены были произведены методом сайт-направленного мутагенеза. Таким образом, были получены мутанты, для которых были измерены температурный оптимум, термостабильность и параметры термоинактивации. Показано, что термостабильность люциферазы RmY увеличилась в ответ на внесение выбранных аминокислотных замен.

Литература

1. Lorenz W.W., McCann R. O., Longiaru M., Cormier M. J. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991 Vol. 88. P. 4438–4442.
2. Франк Л. А., Башмакова Е. Е., Красицкая, В. В., Кудрявцев А. Н. Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы как репортеры для анализа *in vitro*. 2017.
3. Stepanyuk G.A. et al. Coelenterazine-v ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of *Renilla muelleri* luciferase // Anal. Bioanal. Chem. 2010. Vol. 398. P. 1809–1817.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-199

ДИНАМИКА ОТКРЫТИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ ОХОG:C И ОХОG:A
ПО ДАННЫМ МЕТОДИКИ ЯМР ПЕРЕНОСА НАМАГНИЧЕННОСТИ С ВОДЫ*

OXOG:C AND OXOG:A BASE PAIR OPENING DYNAMICS
BY NMR MAGNETIZATION TRANSFER FROM WATER

С. С. Овчеренко^{1,5}, Д. М. Насонов¹, А. В. Шернюков¹, А. В. Ендуткин², Д. О. Жарков^{2,3}, Е. Г. Багрянская¹

¹Институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

³Новосибирский государственный университет

S. S. Ovcherenko^{1,5}, D. M. Nasonov¹, A. V. Shernyukov¹, A. V. Endutkin², D. O. Zharkov^{2,3}, E. G. Bagryanskaya¹

¹Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

³Novosibirsk State University

✉ ovcheren@nioch.nsc.ru

Аннотация

Мы адаптировали протокол ЯМР CLEANEX-PM, чтобы измерить обмен иминопротонов ДНК с протонами воды и изучить динамику открытия пар оснований с 8-оксогуанином (охоG): охоG:C и охоG:A и пар G:C и G:A в модельных дуплексах ДНК. По нашим данным пары охоG:C не открываются легче G:C, что является аргументом против внеспирального захвата охоG гликозилазами Fpg/OGG1. В парах охоG:A равновесие сдвигается на 3–4 порядка в сторону открытого состояния, из чего предполагается внеспиральное распознавание MutY/MUTYH.

Abstract

We adapted the CLEANEX-PM NMR protocol to detect DNA imino proton exchange with water protons and analyze the opening dynamics of base pairs containing 8-oxoguanine (охоG): охоG:C, охоG:A and pairs G:C, G:A in model DNA duplexes. According to our data, the охоG:C pair did not open easier than G:C, arguing against extrahelical base capture by Fpg/OGG1. In the охоG:A mispair the equilibrium is shifted by 3–4 orders of magnitude toward the open state and we hypothesize охоG extrahelical recognition by MutY/MUTYH.

8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-оксогуанин, охоG) является одним из наиболее распространенных окислительных повреждений ДНК (рис. 1), наличие которого приводит к ее дестабилизации и мутациям вида G:C → T:A. Будучи напротив аденина в последовательности ДНК, 8-оксогуанин образует неправильную пару охоG:A (рис. 2). Чтобы предотвратить мутационные изменения ДНК, вызванные наличием 8-оксогуанина, специальные ферменты репарации распознают его и либо вырезают охоG из пар охоG:C (человеческая OGG1 и бактериальная FPG), либо удаляют A из пар охоG:A (бактериальная MutY и человеческая MUTYH). До сих пор неясно, существует ли на раннем этапе общий механизм распознавания охоG этими гликозилазами. Предполагается два

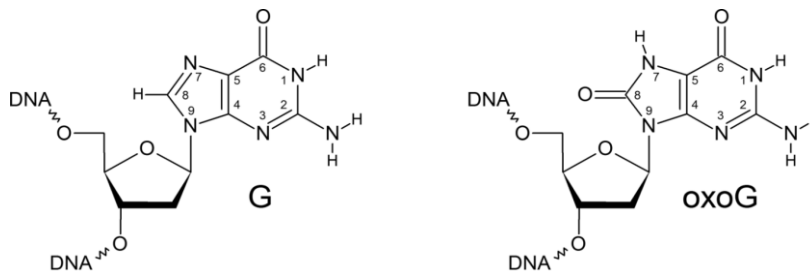


Рис. 1. Структурные формулы гуанина (G) и 8-оксогуанина (охоG) в ДНК
(взято с разрешения из работы [1])

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-14-00219.

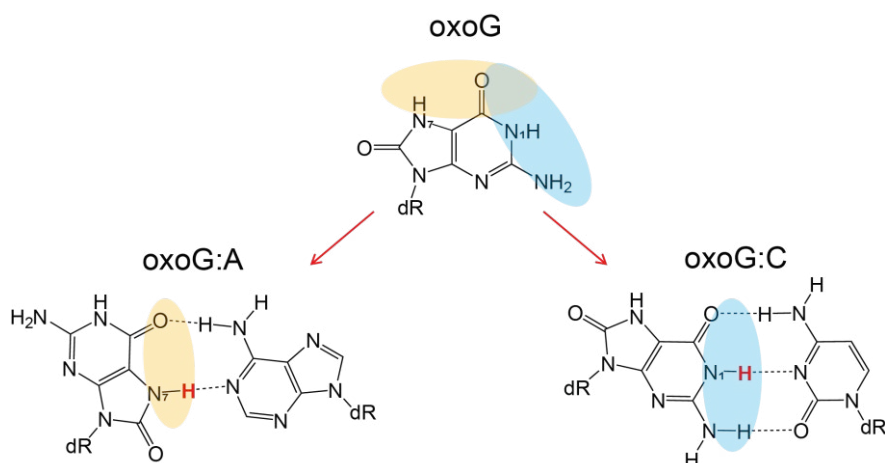


Рис. 2. Структурные формулы Хугстиновской пары oxoG:A и Уотсон-Криковской пары oxoG:C. Красным цветом обозначены иминопротоны, участвующие в водородном связывании. В случае пары oxoG:A водородную связь образует иминопротон N7-H, а в паре oxoG:C — иминопротон N1-H (взято с разрешения из работы [1])

механизма раннего распознавания: активный механизм, когда фермент способствует открытию пары оснований для захвата oxoG, и пассивный механизм, когда он захватывает повреждение в спонтанно открытой паре. Несмотря на кажущуюся значимость динамики открытия – закрытия пар оснований для ответа на этот вопрос, существующая экспериментальная информация по динамике пар с oxoG весьма ограничена.

Химический обмен иминопротонов в ДНК с протонами воды, наблюдаемый в спектрах ЯМР, связан с процессом открытия – закрытия пар оснований. Информацию о кинетике последнего можно извлечь из зависимости константы скорости обмена от концентрации добавляемого катализатора обмена, например, 2,2-дифторэтиламина. В данной работе мы модифицировали протокол ЯМР CLEANEX-PM для измерения констант скорости обмена иминопротонов с протонами воды, чтобы исследовать динамику пар oxoG:C, oxoG:A, G:C и G:A в дуплексах ДНК, моделирующих наихудшую и наилучшую укладку для G/oxoG. Наши результаты показывают, что пары oxoG:C оказываются в целом стабильнее пар G:C, что указывает на более вероятный активный механизм распознавания oxoG гликозилазами OGG1 и FPG. При этом дестабилизация дуплекса при наличии oxoG достигается за счет уменьшения стабильности соседних с oxoG:C пар оснований. При этом по нашим данным наличие oxoG:C не всегда приводит к дестабилизации ДНК. В случае oxoG:A основание oxoG оказывается на 3–4 порядка более доступным в своем внеспиральном положении, чем в oxoG:C, что указывает на более вероятный пассивный механизм распознавания oxoG ферментами MutY/ MUTYH. Результаты данной работы приведены в статье [1].

Литература

1. Ovcherenko S. S., Shernyukov A. V., Nasonov D. M. et al. Dynamics of 8-Oxoguanine in DNA: Decisive Effects of Base Pairing and Nucleotide Context // Journal of the American Chemical Society. 2023. Vol. 145 (10). P. 5613–5617.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-200

**ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА
ПРИ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ***

**APPLICATION OF RAMAN SPECTROSCOPY TO THE CHARACTERIZATION
OF THE METABOLISM OF MOUSE PREIMPLANTATION EMBRYOS**

А. Н. Омельченко^{1,2}, К. А. Окотруб¹, Н. В. Суровцев¹, Т. Н. Игонина³, Е. Ю. Брусенцев^{1,3}, С. Я. Амстиславский^{1,3}

¹*Институт автоматики и электрометрии СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет*

³*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

A. N. Omelchenko^{1,2}, K. A. Okotrub¹, N. V. Surovtsev¹, T. N. Igonina³, E. Yu. Brusentsev^{1,3}, S. Y. Amstislavsky^{1,3}

¹*Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

³*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

✉ a.omelchenko@g.nsu.ru

Аннотация

В работе предложен подход к описанию метаболизма преимплантационных эмбрионов мыши с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света дейтерированных меток. Показано, что после криоконсервации наблюдаются изменения транспорта жирных кислот (стеариновая кислота), аминокислот (фенилаланин и лейцин) и глюкозы.

Abstract

The research demonstrates the description of the metabolism of mouse preimplantation embryos by Raman spectroscopy using deuterated labels. We observe changes in the transport of fatty acids (stearic acid), amino acids (phenylalanine and leucine) and glucose after embryos cryopreservation.

Клеточный метаболизм — это мощный индикатор, позволяющий исследовать реакцию организма на изменяющиеся условия окружающей среды. Отслеживать активность конкретного пути обмена веществ позволяет использование меченых, в том числе дейтерированных, молекул. Они встраиваются в организм и по специфичному для них метаболическому пути претерпевают трансформации, в результате чего образуются меченые метаболиты. В задачах современной биологии для их детектирования зачастую требуются бесконтактные и неразрушающие методики, позволяющие делать измерения от одиночных клеток. Одной из таких является спектроскопия комбинационного рассеяния света, которая к тому же оказывается удобной при изучении дейтерированных соединений. Это связано с тем, что спектры дейтерированных молекул не перекрываются со спектрами других биологических молекул, что позволяет делать количественные оценки.

В данной работе мы демонстрируем методику спектроскопии комбинационного рассеяния света дейтерированных меток как мощный инструмент, позволяющий отслеживать активность метаболизма преимплантационных эмбрионов мыши. Мы рассматривали вопросы влияния процедуры криоконсервации по протоколам программного замораживания и витрификации на метаболизм липидов, белков, глюкозы и воды. Эмбрионы культивировались в течение суток в средах с содержанием дейтерированной стеариновой кислоты, дейтерированных аминокислот (фенилаланина и лейцина), дейтерированной глюкозы и тяжелой воды. Эмбрионы были получены, криоконсервированы и подготовлены сотрудниками сектора криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН.

Было показано, что при культивировании эмбрионов мыши в растворе с содержанием 20 % тяжелой воды не образуется новых дейтерированных соединений, что может быть связано с ее токсическим действием. Обнаружено, что эмбрионы, пережившие криоконсервацию, на первые сутки культивирования накапливают в 1,8 раз больше жиров, чем контрольная группа [1]. Данный эффект заметен для морул, что связано с появлением новых метаболических путей при достижении более высокой стадии развития. При этом на вторые сутки культивирования различия в метаболизме липидов не наблюдаются. Также было выяснено, что механизм внутриклеточных повреждений в результате криоконсервации универсален как для протоколов программного замораживания, так

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-74-10108.

и для витрификации. По спектрам комбинационного рассеяния не выявлено значимых различий между экспериментальными группами эмбрионов при их культивировании в присутствии аминокислот. По-видимому, встраивание аминокислот в белки происходит без химических трансформаций. Также показано, что дейтерированная глюкоза накапливается эмбрионами мышцы преимущественно в виде гликогена и пентоз. В случае аминокислот и глюкозы также выявлено, что транспорт данных веществ усиливается при увеличении стадии развития.

Таким образом, в работе мы рассмотрели применение метода спектроскопии комбинационного рассеяния света дейтерированных меток при характеристике метаболизма эмбрионов мышцы. Данная методика может быть также полезна при описании обмена веществ других живых организмов.

Литература

1. Omelchenko A. N., Igonina T. N., Brusentsev E. Y. et al. Cryopreservation increases accumulation of exogenous stearic acid in mouse embryos // *Cryobiology*. 2022. Vol. 109. P. 44–52.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-201

**ИЗУЧЕНИЕ ФОТОЗАЩИТНЫХ БИОМОЛЕКУЛ
ХРУСТАЛИКОВ ГЛАЗ ЖИВОТНЫХ*****STUDY OF PHOTOPROTECTIVE BIOMOLECULES
OF THE ANIMAL EYE LENSES**Н. А. Осик^{1,2}, Ю. П. Центалович¹¹*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*
²*Новосибирский государственный университет*N. A. Osik^{1,2}, Yu. P. Tsentalovich¹¹*International Tomography Centre SB RAS, Novosibirsk*
²*Novosibirsk State University*

✉ n.osik@tomo.nsc.ru

Аннотация

Изучение метаболомного состава хрусталиков животных и анализ фотохимических свойств молекул позволили выявить биомолекулы, участвующие в защите компонентов глаза от УФ-излучения. Овотиол А — один из сильнейших природных антиоксидантов, обнаруженный в хрусталиках рыб, который активно тушит фотовозбужденные триплетные состояния молекул. НАД-Н является естественным УФ-фильтром хрусталика некоторых птиц.

Abstract

By studying the metabolomic composition of animal eye lenses and analyzing photochemical properties of certain molecules, we found two biomolecules with unusual photoprotective properties. Ovothiols A, one of the strongest natural antioxidants, was found in fish lenses where it is able to quench photoexcited triplet states. NADH was found to be a natural UV filter in the lenses of some birds.

Хрусталик — уникальная биологическая линза, проводящая свет и фокусирующая его на сетчатке глаза. Ткань хрусталика постоянно подвергается воздействию УФ-излучения, вызывающего повреждения ткани посредством активной генерации активных форм кислорода, свободных радикалов и реакционно-активных триплетных состояний молекул. В силу особенностей клеточного строения хрусталика механизмы защиты ткани от вредоносного воздействия УФ главным образом основаны на реакциях с участием метаболитов. Например, в хрусталике человека фотопротекторные функции выполняют молекулярные УФ-фильтры (кинурины и его производные), поглощающие свет УФ-А диапазона (315–400 нм), а также антиоксиданты аскорбиновая кислота и глутатион (GSH), ответственные за нейтрализацию радикалов и триплетных состояний. В настоящее время механизмы фотозащиты в зрительной системе животных остаются во многом неизученными. В результате количественного метаболомного профилирования тканей животных нам удалось обнаружить биомолекулы, обладающие выраженными антиоксидантными и фотопротекторными свойствами.

При анализе метаболома тканей рыб было обнаружено, что хрусталики некоторых пресноводных и морских рыб содержат необычно высокую концентрацию овотиола А (OSH) — одного из сильнейших природных антиоксидантов. Исследование окислительно-восстановительных свойств OSH показало эффективность антиоксидантной пары OSH — GSH в нейтрализации окислителей: OSH с высокой скоростью тушит реакционно-активные молекулы, восстанавливаясь затем при взаимодействии с GSH. Что еще более важно, была обнаружена способность OSH к тушению фотоиндуцированного триплетного состояния кинуреновой кислоты с диффузионно-контролируемой константой скорости. Таким образом, OSH является не только отличным протектором от окислительного стресса, но и обеспечивает фотозащиту, снижая степень воздействия солнечного УФ-излучения на ткань хрусталика.

При анализе метаболомного состава хрусталиков птиц мы обнаружили аномально высокую концентрацию восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н) в хрусталиках некоторых птиц из семейства ястребиных и поганковых. Фотохимический анализ продемонстрировал эффективность НАД-Н как молекулярного УФ-фильтра: соединение обладает высоким поглощением в диапазоне 300–400 нм, высо-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-23-00021.

© Н. А. Осик, Ю. П. Центалович, 2023

кой фотостабильностью, а также низким выходом триплетного состояния, флуоресценции и фотоиндуцированных радикальных форм. Таким образом, впервые было обнаружено, что НАД-Н является естественным УФ-фильтром хрусталиков некоторых птиц, соединение защищает компоненты глаза от повреждений, вызванных УФ-излучением, а также способствует повышению остроты зрения птиц, уменьшая хроматические aberrации.

Наши результаты, в дополнение к уже опубликованным данным, демонстрируют разнообразие адаптационных механизмов, способствующих защите глаза животных от вредоносного УФ-излучения. Изучение метаболома тканей животных позволяет найти уникальные молекулы, такие как OSH, а также открыть новые грани биологической функциональности таких известных молекул, как НАД-Н.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-202

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КЛОБЕТАЗОЛА НА ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ

STUDY OF THE EFFECT OF CLOBETASOL ON CHANGES IN THE CONTENT OF NERVE GROWTH FACTOR AND THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF DAMAGED SOMATIC NERVES

М. В. Парчайкина, Т. П. Кузьменко, Е. В. Попков, А. В. Заварыкина, Н. Е. Аржанов, В. В. Ревин

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск

M. V. Parchaykina, T. P. Kuzmenko, E. V. Popkov, A. V. Zavarykina, N. E. Arzhanov, V. V. Revlin

Ogarev Mordovia State University, Saransk

✉ zyuzina-tatjana@mail.ru

Аннотация

В ходе проведенных исследований было показано, что использование клобетазола сопровождается увеличением содержания фактора роста нервов (NGF) и общего белка, а также восстановлением проводимости нервных волокон, что указывает на его участие в запуске регенерационных сигнальных путей, отвечающих за активацию белкового синтеза и восстановление функциональной активности травмированных соматических нервов.

Abstract

In the course of the studies, it was shown that the use of clobetasol is accompanied by an increase in the content of nerve growth factor and total protein, as well as the restoration of the conductivity of nerve fibers, which indicates its participation in the launch of regenerative signaling pathways responsible for the activation of protein synthesis and the restoration of the functional activity of injured somatic nerves.

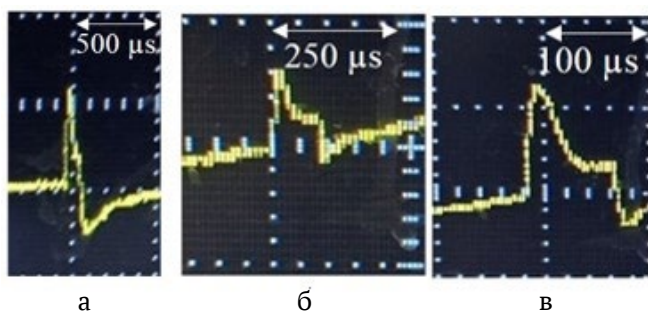
В настоящее время проблема регенерации нервной ткани остается одной из самых актуальных и малоизученных, в связи с чем в последние годы наметился определенный прогресс в изучении нейротрофического действия различных физиологически активных веществ и их роли в регуляции сигнальных путей, участвующих в запуске процессов восстановления функционирования поврежденных нервов [1]. В связи с этим особый интерес представляют глюкокортикоиды, в частности, клобетазол, одним из побочных эффектов которого является усиление дифференцировки и пролиферации нейрональных стволовых клеток [2]. Тем не менее его роль в регуляции регенерационных процессов и активации различных сигнальных каскадов при патологии соматических нервов остается неизученной.

Цель данной работы — исследование влияния клобетазола на изменение уровня нейротрофических факторов и количественного содержания белка, а также восстановление проводимости травмированных нервов.

На фоне введения клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг в проксимальном отрезке нерва достоверное изменение содержания NGF отмечается к 14-м суткам наблюдения и сопровождается увеличением его уровня в 3,36 раза по сравнению с контролем. В дистальном его участке происходят следующие изменения: концентрация NGF увеличивается в 1,88 раза и 2,4 раза соответственно по отношению к контролю спустя 7 и 14 суток эксперимента. На 30-е сутки после повреждения наблюдается незначительное увеличение содержания NGF на 9,1 % по сравнению с интактным нервом.

Согласно литературным данным, взаимодействие NGF с рецептором p75NTR и различными изоформами Trk-рецепторов сопровождается активацией фосфатидилинозитол-3-киназного (PIK3/Akt) и митогенактивируемого протеинкиназного (MAPK/ERK) сигнальных путей. В результате повышается экспрессия различных факторов транскрипции, контролирующих синтез отдельных белковых фракций, необходимых для восстановления функциональной активности поврежденных нервных волокон [2].

Было показано, что при введении клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг в проксимальном участке нерва к 7-м и 14-м суткам наблюдения содержание белка практически не отличается от соответствующих значений по сравнению с поврежденным нервным проводником. Тем не менее спустя 30 суток после перерезки концентрация белка в этом варианте опыта достигает контрольного уровня. В дистальном отрезке нерва на фоне действия препарата достоверных изменений содержания белковой фракции относительно варианта опыта с повреждением не наблюдается на протяжении всего периода эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о глубоких



Потенциал действия соматического нерва крысы. Масштаб по шкале потенциала: 100 мВ на клетку. Интактный нерв (а), 24-е сутки после повреждения (б) и при в/м введении клобетазола (в)

дегенерационных процессах именно в этом отрезке нервного проводника в связи с исчезновением центральной регуляции и отсутствием регуляторных механизмов.

В результате полученной травмы проводимость нерва заметно снижается в проксимальном его участке и полностью утрачивается в дистальном отрезке нервного проводника. С увеличением времени эксперимента восстановление способности проведения потенциала действия с небольшой амплитудой отмечается только в проксимальном участке нерва за счет сохранения центральной иннервации. В серии опытов с введением препарата способность проводить ПД практически восстанавливается до контрольных значений (см. рисунок).

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать предположение о наличии у клобетазола стимулирующего действия на регенерацию поврежденных нервных проводников за счет связывания с глюкокортикоидными рецепторами нервных клеток и повышения содержания NGF, который участвует в запуске внутриклеточных сигнальных каскадов, связанных с усилением белкового синтеза и восстановлением функциональной проводимости поврежденных нервных волокон

Литература

1. Pinyaev S. I., Kuzmenko T. P., Revina N. V. et al. Influence of Resveratrol on Oxidation Processes and Lipid Phase Characteristics in Damaged Somatic Nerves // *Biomed Res Int*. 2019. Vol. 2019. P. 2381907.
2. Shi W., Bi S., Dai Y. et al. Clobetasol propionate enhances neural stem cell and oligodendrocyte differentiation // *Exp Ther Med*. 2019. Vol. 18 (2). P. 1258–1266.
3. Кузьменко Т. П., Парчайкина М. В., Ревина Э. С. и др. Влияние нейротрофических факторов на состав белков при повреждении и регенерации соматических нервов // *Биофизика*. 2023. Т. 68, № 2. С. 334–348.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265–275.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-203

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ РАСТЕНИЙ
В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ*****ANALYSIS OF THE GENETIC REGULATION OF PLANT'S STRESS SIGNALS
UNDER CHRONIC IRRADIATION**

П. А. Пирогова, Т. А. Здобнова, М. А. Гринберг, В. А. Воденев

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

P.A. Pirogova, T.A. Zdobnova, M.A. Greenberg, V.A. Vodeneev

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ poly.h@mail.ru

Аннотация

В естественных условиях особое значение имеет влияние ионизирующего излучения (ИИ) на стрессовые сигналы растений, в частности, электрические. Возможный механизм — изменение экспрессии генов. При хроническом облучении пшеницы (*Triticum aestivum* L.) показано уменьшение экспрессии гена калиевых каналов SKOR, что позволяет определить вклад генетической регуляции в эффекты ИИ на стрессовый сигналинг.

Abstract

In natural conditions, the influence of ionizing radiation (IR) on plant's stress signals, in particular, electrical, is important. A possible mechanism is a change in gene expression. Under chronic irradiation of wheat (*Triticum aestivum* L.), a decrease in the expression of the SKOR potassium channel gene was shown. Thus, the contribution of genetic regulation to the IR's effects on stress signaling is possible.

Растения могут быть подвержены влиянию повышенного уровня ионизирующего излучения (ИИ), произрастающая на загрязненных радионуклидами территориях или в условиях космического полета. Реализация влияния ИИ возможна путем изменения стрессовых сигналов, способствующих формированию адаптаций к неблагоприятным факторам окружающей среды. Особый интерес среди прочих стрессовых сигналов вызывают электрические сигналы (ЭС), представляющие собой распространяющиеся изменения мембранного потенциала в ответ на различные раздражители. В генерации и распространении ЭС ключевую роль играют следующие системы: ионные каналы различных типов, протонная АТФаза и системы генерации активных форм кислорода (АФК). Распространение ЭС приводит к модификации активности ряда физиологических процессов (фотосинтеза, транспирации, дыхания). На сегодняшний день при хроническом облучении показаны изменения параметров ЭС, вызванных локальным стрессом. Наблюдаемые модификации могут быть объяснены изменением экспрессии генов, что обусловлено прямым (деструктивное действие ИИ) и косвенным (изменение активности транскрипционных факторов) влиянием ИИ. Цель данной работы — анализ вклада генетической регуляции в эффекты ИИ на ЭС растений.

В качестве объекта исследования использовали 15-дневные проростки пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта Дарья. Экспериментальную группу облучали с помощью β -излучателя ^{90}Sr - ^{90}Y с активностью 0,1 МБк и мощностью дозы примерно 31,3 мкГр/час. Облучение продолжали весь период выращивания. Максимальная накопленная доза составила около 11,3 мГр. Эффект ИИ оценивали по параметрам ЭС, которые регистрировали экстраклеточно с помощью AgCl макроэлектродов. Локальный стресс создавали нагреванием до 65 °С кончика второго листа пшеницы в заполненной водой ячейке в течение 7 мин. Оценку генетической регуляции проводили путем анализа экспрессии генов. В работе анализировали гены белков, потенциально обуславливающие эффекты ИИ на электрогенез. Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в реальном времени. Дизайн праймеров интересующих генов для ПЦР в реальном времени проводили с соблюдением необходимых параметров. В качестве эндогенного контроля использовали β -актин (*ACTB*) и гомолог белка слияния вакуолей (*MON1*). Полученные результаты анализировали по методике $\Delta\Delta\text{Ct}$.

У растений, выросших в условиях хронического облучения, возрастают амплитуда и скорость распространения электрических сигналов. На основании проведенного теоретического анализа потенциальных мишеней ИИ

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00340.

© П. А. Пирогова, Т. А. Здобнова, М. А. Гринберг, В. А. Воденев, 2023

выявлены ключевые компоненты электрогенеза, воздействие на которые может объяснить наблюдаемую в экспериментах модификацию ЭС. К ним относятся, в первую очередь, H^+ -АТФаза, NADPH-оксидаза и ионные каналы различных типов. В ходе работы подобраны праймеры для генов белков, участвующих в генерации и распространении ЭС: H^+ -АТФазы (*HAI*), NADPH-оксидазы (*RBOHs*), анионных (*CLC1* и *ALMT1*), калиевых (*SKOR* и *AKT1*) и кальциевых (*TPC1*) каналов. По результатам ПЦР в реальном времени определили относительный уровень экспрессии генов интереса у облученных растений. Показано, что экспрессия гена калиевого канала *SKOR* уменьшилась под влиянием ИИ. Проведенный анализ относительной экспрессии компонентов электрогенеза позволяет определить вклад генетической регуляции в эффекты ИИ на стрессовый сигналинг.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-204

КОМПРЕССИОННАЯ ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ЭЛАСТОГРАФИЯ КАК НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ОЦЕНКИ СТРУКТУРЫ ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ ПО МОДУЛЮ УПРУГОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ***COMPRESSION OPTICAL COHERENCE ELASTOGRAPHY AS A NEW METHOD FOR ENDOMETRIAL TISSUE STRUCTURE ASSESSMENT BY MORPHOLOGICAL COMPONENTS ELASTICITY**

А. А. Плеханов¹, А. А. Советский², М. М. Логинова¹, Е. А. Аветисян³, А. А. Шепелева³,
А. М. Шутова¹, С. В. Гамаюнов³, Г. О. Гречканев¹, М. А. Сироткина¹, В. Ю. Зайцев², Н. Д. Гладкова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

²Институт прикладной физики им. А. В. Гапонова-Грехова РАН, Нижний Новгород

³Нижегородский областной клинический онкологический диспансер

A. A. Plekhanov¹, A. A. Sovetsky², M. M. Loginova¹, E. A. Avetisyan³, A. A. Shepeleva³,
A. M. Shutova¹, S. V. Gamayunov³, G. O. Grechkanev¹, M. A. Sirotkina¹, V. Yu. Zaitsev², N. D. Gladkova¹

¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod

²Gaponov-Grekhov Institute of Applied Physics RAS, Nizhny Novgorod

³Nizhny Novgorod Regional Oncologic Hospital

✉ strike_gor@mail.ru

Аннотация

В настоящее время не существует эффективного клинического инструмента для оценки морфологии эндометрия, исключающего травматизацию ткани и позволяющего производить периодический мониторинг в процессе лечения. Представленная работа направлена на разработку нового подхода к прижизненному исследованию морфологии ткани эндометрия для дифференциальной диагностики патологий методом компрессионной оптической когерентной эластографии.

Abstract

Currently, there is no effective clinical tool for evaluation the human endometrium morphology, excluding tissue trauma, and which would allow to perform the periodic monitoring during treatment. This study is aimed to develop a new approach to in vivo study of endometrial tissue morphology for diagnosis of pathologies using compression optical coherence elastography.

Рак эндометрия занимает пятое место среди всех онкопатологий и влияет на репродуктивную функцию женщины [1]. При диагностике рака эндометрия используются различные клинко-диагностические инструменты. Ультразвуковое исследование и магнитно-резонансная томография позволяют только измерить толщину эндометрия, а гистероскопическая оценка позволяет визуально определить локализацию подозрительного на патологию участка ткани. Для морфологической верификации рака и дифференциальной диагностики от других гиперпластических процессов эндометрия проводят диагностическое выскабливание полости матки. Данная процедура отличается высокой травматичностью и негативно влияет на репродуктивную функцию женщины. Поэтому существует потребность в новом диагностическом инструменте для высокоточной и минимально инвазивной морфологической оценки ткани эндометрия.

Наше исследование направлено на определение возможностей нового диагностического метода компрессионной оптической когерентной эластографии (К-ОКЭ) для морфологической диагностики патологий эндометрия. К-ОКЭ позволяет без использования красителей исследовать гетерогенную структуру биологической ткани на основе различий в упругих свойствах морфологических компонентов с разрешением до 40 мкм [2]. Ранее нами была продемонстрирована эффективность К-ОКЭ при визуализации ткани молочной железы [3] и толстой кишки [4] для определения топографии и морфомолекулярного статуса рака. Продемонстрирована способность К-ОКЭ идентифицировать даже небольшие скопления раковых клеток [5], что потенциально позволяет проводить прицельную биопсию рака эндометрия. В представленной работе основной целью было изучение эластических свойств ткани эндометрия в норме и при различных патологиях с помощью К-ОКЭ.

* Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 23-25-00405, <https://rscf.ru/project/23-25-00405/>.

При *ex vivo* оценке операционного материала определены эластические свойства морфологических компонентов ткани полости матки в норме (эндометрия и миометрия), при типичных гиперпластических процессах эндометрия, при эндометриоидной аденокарциноме низкой и высокой степеней злокачественности (раковые клетки и строма). Методом К-ОКЭ были установлены более высокие значения жесткости (более 400 кПа) для раковых клеток и более низкие значения жесткости (менее 400 кПа) для нераковых тканей. Установленные различия в эластических свойствах свидетельствуют о потенциальной возможности использования метода К-ОКЭ для диагностики патологий эндометрия [6]. Будущие исследования будут сосредоточены на разработке подхода к *in vivo* К-ОКЭ гистероскопической оценке ткани эндометрия.

Литература

1. Ghoubara A., Price M. J., Fahmy M. S. E. et al. Prevalence of hyperplasia and cancer in endometrial polyps in women with postmenopausal bleeding: A systematic review and meta-analysis // *Post Reproductive Health*. 2019. Vol. 25. P. 86–94.
2. Zaitsev V. Y., Matveyev A. L., Matveev L. A. et al. Strain and elasticity imaging in compression optical coherence elastography: The two-decade perspective and recent advances // *Journal of Biophotonics*. 2021. Vol. 14 (2). P. e202000257.
3. Plekhanov A. A., Gubarkova E. V., Sirotkina M. A. et al. Compression OCT-elastography combined with speckle-contrast analysis as an approach to the morphological assessment of breast cancer tissue // *Biomedical Optics Express*. 2023. Vol. 14 (6). P. 3037–3056.
4. Plekhanov A. A., Sirotkina M. A., Gubarkova E. V. et al. Towards targeted colorectal cancer biopsy based on tissue morphology assessment by compression optical coherence elastography // *Frontiers in Oncology*. 2023. Vol. 13. P. 1121838.
5. Plekhanov A. A., Sirotkina M. A., Sovetsky A. A. et al. Histological validation of *in vivo* assessment of cancer tissue inhomogeneity and automated morphological segmentation enabled by Optical Coherence Elastography // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10 (1). P. 11781.
6. Grechkanov G. O., Plekhanov A. A., Loginova M. M. et al. The first experience of using multimodal optical coherence tomography for diagnosing endometrial hyperplastic processes // *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2023. Vol. 5.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-205

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ВЛИЯЕТ НА ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА И НЕЙТРАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА МИТОХОНДРИЯМИ*

LOCALIZATION OF MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS AFFECTS THE PATTERN OF CHANGES IN THE PRODUCTION AND NEUTRALIZATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY MITOCHONDRIA

Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров

Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева

D. Yu. Popov, M. S. Kazakov, E. Yu. Shitikova, A. Y. Vinokurov

Cell Physiology and Pathology Laboratory, Turgenev Orel State University

✉ rennda@yandex.ru

Аннотация

Механизм влияния мутаций мтДНК на изменение окислительно-восстановительного баланса зависит от их нахождения в геноме. В то время как повреждение гена цитохрома b вызывает снижение скорости утечки электронов в матрикс митохондрий и межмембранное пространство и соразмерное уменьшение содержания восстановленного глутатиона, мутации генов рРНК и тРНК или субъединиц комплекса I приводят к росту образования АФК и дефициту антиоксидантной системы.

Abstract

The mechanism of the effect of mtDNA mutations on changes in redox balance depends on their location in the genome. While damage to the cytochrome b gene causes a decrease in the rate of electron leakage into the mitochondrial matrix and intermembrane space and a commensurate decrease in the content of reduced glutathione, mutations of rRNA and tRNA genes or subunits of complex I lead to an increase in AFC formation and deficiency of the antioxidant system.

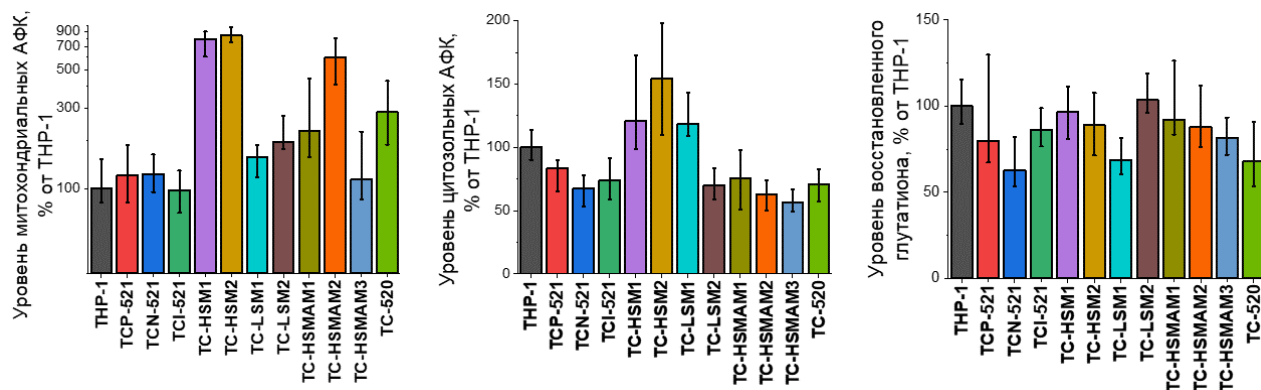
Митохондриальный геном подвержен частым мутациям, поскольку располагается вблизи электронтранспортной цепи (ЭТЦ), являющейся основным местом образования активных форм кислорода (АФК) в клетке. При этом возникающие повреждения имеют тенденцию к закреплению ввиду низкой эффективности системы репарации и чаще всего влияют на экспрессию кодируемых продуктов по причине практически полного отсутствия в молекуле митохондриальной ДНК (мтДНК) некодирующих участков [1]. В литературе показана связь многих мутаций мтДНК с заболеваниями [2], однако большинство исследований выявляет корреляцию между уровнем гетероплазии отдельных мутаций и фенотипом без объяснения механизма возникновения патологии. Поскольку мтДНК кодирует субъединицы комплексов ЭТЦ, логично предположить, что мутации в соответствующих генах могут приводить к изменению скорости утечки электронов и, как следствие, нарушению окислительно-восстановительного баланса — соотношения между образованием и нейтрализацией АФК. В связи с этим целью данной работы было выявление степени и направления изменения редокс-баланса в клетках под влиянием различных комбинаций мутаций мтДНК.

Объектами исследования выступали линии цитоплазматических гибридов (цибридов), созданных на базе ТНР-1 с использованием клеток пациентов, страдающих от митохондриальных заболеваний и характеризующихся различными сочетаниями мутаций мтДНК как на качественном (локализация мутаций), так и количественном (степень гетероплазии) уровне. Уровень цитозольных АФК, которые частично связаны с утечкой электронов с комплекса III ЭТЦ в межмембранное пространство митохондрий, оценивали с помощью широкопольного флуоресцентного микроскопа по скорости изменения соотношения окисленной и восстановленной форм дигидроэтидия (5 мкМ). Уровень митохондриальных АФК, определяемых утечкой электронов в матрикс митохондрий с комплексов I и III ЭТЦ, определяли методом конфокальной микроскопии по скорости изменения флуоресценции MitoTracker Red CM-XRos (500 нМ), который образуется в результате накопления в митохондриях и окисления его восстановленной формы. Для оценки уровня восстановленного глутатиона (GSH) в клетках проводили анализ интенсивности флуоресценции зонда монохлорбиман (50 мкМ), который в результате взаимодействия с GSH образует флуоресцирующие конъюгаты.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-15-00317.

© Д. Ю. Попов, М. С. Казаков, Е. Ю. Шитикова, А. Ю. Винокуров, 2023

Полученные данные подтверждают предположение о влиянии мутаций на рассматриваемые параметры, которые характеризуются как увеличением, так и уменьшением относительно линии ТНР-1 (см. рисунок). Это может свидетельствовать о том, что нарушения редокс-баланса и потенциально связанные с ними заболевания могут развиваться за счет различных механизмов.



Изменение параметров окислительно-восстановительного баланса в клетках с множественными мутациями митохондриального генома

Проведенный анализ полученных экспериментальных данных позволил сгруппировать клеточные линии по характеру изменения исследуемых параметров. В случае линий ТСР-521, ТСН-521, ТСИ-521 и ТС-НСММ3 наблюдается снижение уровня цитозольных АФК, GSH и статистически незначимое изменение уровня митохондриальных АФК. Эти линии характеризуются наиболее высокими уровнями гетероплазии мутации m.14846G>A в гене МТ-СУТВ, кодирующем субъединицу комплекса III ЭТЦ. Мы предполагаем, что такие изменения параметров окислительно-восстановительного баланса являются результатом снижения скорости митохондриального метаболизма из-за нарушения работы комплекса III, который играет центральную роль в транспорте электронов митохондрий на цитохром-с-оксидазу [3].

В случае линий ТС-НСМ1, ТС-НСМ2 и ТС-ЛСМ1 происходит увеличение уровня АФК как в цитозоле клеток, так и в матриксе митохондрий вместе с одновременным снижением уровня GSH. В этих клетках преобладают мутации del652G, m.1555A>G, m.3256C>T и m.12315G>A в генах МТ-РНР1, МТ-ТЛ1 и МТ-ТЛ2, кодирующих митохондриальные рРНК и тРНК. Такие изменения могут быть результатом нарушения соотношения между белками ЭТЦ, а также формируемыми ими комплексами, и увеличением утечки электронов из-за соответствующего нарушения транспорта электронов.

Линии ТС-НСММ1, ТС-НСММ2 и ТС-520 показывают рост уровня митохондриальных АФК, а также уровня снижения цитозольных АФК и GSH. Эти линии имеют высокие уровни гетероплазии мутаций m.3336T>C, m.5178C>A, и m.13513G>A в генах МТ-НД1, МТ-НД2 и МТ-НД5, кодирующих различные субъединицы комплекса I. Очевидно, что вызываемые мутациями изменения приводят к снижению эффективности работы именно НАДН-дегидрогеназного комплекса и соответствующему увеличению утечки электронов в матриксе митохондрий.

Литература

1. Taanman J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1999. Vol. 1410, № 2. P. 103–123.
2. Mustafa M. F. et al. Pathogenic mitochondria DNA mutations: current detection tools and interventions // *Genes*. 2020. Vol. 11, № 2. P. 192.
3. Ahmad M., Wolberg A., Kahwaji C. I. *Biochemistry, electron transport chain*. 2022.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-206

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОЦЕССОВ МАССОПЕРЕНОСА И АДсорбЦИИ
НА АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОСЕНСОРОВ, ОСНОВАННЫХ
НА МИКРОПОРИСТЫХ МЕМБРАНАХ*****THE STUDY OF THE INFLUENCE OF MASS TRANSFER AND ADSORPTION PROCESSES ON
ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF MICROPOROUS MEMBRANE-BASED BIOSENSORS**К. А. Прусаков^{1,2}, А. Е. Сидорова², А. А. Маслакова², Е. Р. Павлова¹, Д. В. Багров^{1,2}¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, Москва²Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. ЛомоносоваK. A. Prusakov¹, A. E. Sidorova², A. A. Maslakova², E. R. Pavlova¹, D. V. Bagrov^{1,2}¹Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University

✉ k.prusakov@rcpcm.org

Аннотация

Предложена и исследована теоретическая модель кинетики образования молекулярных комплексов на твердой поверхности внутри микропористой мембраны. Численные расчеты показали значения, сопоставимые с результатами экспериментов. С помощью данной модели были установлены закономерности, которые могут быть использованы для улучшения аналитических характеристик биосенсоров.

Abstract

We proposed a theoretical model of molecular complexes' formation kinetics on a solid surface inside a microporous membrane. Numerical calculations yielded values comparable with the experimental results. Using the model, we established dependencies that can be used to improve the analytical characteristics of biosensors.

Биосенсоры, работа которых основана на образовании специфического иммуносэндвича на твердой поверхности, занимают важное место среди современных аналитических методик. Микропористые и нетканые мембраны за счет большой удельной площади поверхности считаются перспективным объектом для использования в роли носителя сенсорного слоя в таких системах [1]. Однако преимущество развитой поверхности во многих случаях оборачивается недостатком, так как структура мембраны ограничивает доступ молекул аналита к сайтам связывания, расположенным внутри нее. Наиболее простой способ преодолеть этот недостаток — организовать принудительную «доставку» аналитов за счет потока жидкости, создаваемого внешним источником давления. В такой системе мембрана представляет собой проточную реакционную камеру со сложной пространственной структурой. Для проточных реакционных камер простой геометрии существует развитая теория, позволяющая определить режим работы сенсора и характерные времена достижения стационарного состояния или насыщения [2]. Однако в известной нам литературе не описана модель биосенсора на основе микропористой или нетканой мембраны.

В данной работе предложена теоретическая модель, описывающая процессы массопереноса и адсорбции на внутренней поверхности микропористой мембраны. Модель основана на системе дифференциальных уравнений, которая учитывает основные явления, влияющие на образование молекулярных комплексов в данной системе: диффузию, течение жидкости и химическую кинетику образования и распада молекулярных комплексов. Мембрана была смоделирована как участок пространства с определенным размером, в котором сайты связывания равномерно распределены по объему. Для того чтобы учесть тот факт, что структура мембраны препятствует перемещению молекул аналита, были введены поправки на коэффициент диффузии. Таким образом, при решении уравнений диффузии использовался эффективный коэффициент диффузии, значение которого меньше величины коэффициента диффузии для аналогичных молекул в свободном объеме. Сложное пространственное распределение скоростей потоков жидкости внутри мембраны также было упрощено — использовался плоский профиль скоростей. Иными словами, во всех участках мембраны линейные скорости потоков жидкости принимались равными между собой и направленными перпендикулярно внешней грани мембраны. Для описания химической

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-74-10042.

кинетики образования и распада молекулярных комплексов использовалась модель изотермы Ленгмюра (монослойная адсорбция с конечной емкостью без дисперсии констант прямой и обратной реакции). Численное решение систем дифференциальных уравнений проводили с помощью системы Wolfram Mathematica.

Основная задача работы заключалась в том, чтобы теоретически количественно исследовать перенос молекул аналита к сайтам связывания, расположенным внутри мембраны, с помощью потока жидкости. Для этого были проведены расчеты, соответствующие двум способам «доставки» аналита в мембрану. Первый способ представляет собой инкубацию мембраны в растворе аналита. В таком эксперименте происходит механическое перемешивание раствора в объеме, однако нет принудительной прокачки жидкости через мембрану. Это значит, что молекулы аналита могут поступать в толщу мембраны только за счет диффузии. Во втором случае весь объем раствора аналита последовательно прокачивается сквозь мембрану. При этом доставку молекул аналита обеспечивает как диффузия, так и перенос потоком жидкости. В результате были получены и исследованы временные зависимости количества аналита, связанного мембраной. Было проведено сравнение полученных результатов с результатами проделанной ранее экспериментальной работы, выполненной с электроформованными мембранами [3].

Несмотря на кажущиеся серьезные упрощения модели относительно реальной системы, расчеты показали, что отношение величин связанного с мембраной аналита в случае прокачки и в случае инкубации согласуется с экспериментальными результатами по порядку величины. Разница результатов моделирования и эксперимента, вероятно, в первую очередь обусловлена не описанными упрощениями, а тем, что в экспериментах использовались малые количества аналита, что приводило к заметному падению концентрации во внешних резервуарах.

Литература

1. Pavlova E. R., Maslakova A. A., Prusakov K. A., Bagrov D. V. Optical sensors based on electrospun membranes—principles, applications, and prospects for chemistry and biology // *New Journal of Chemistry*. 2022. Vol. 46 (18). P. 8356–8380.
2. Squires T. M., Messinger R. J., Manalis S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors // *Nature biotechnology*. 2008. Vol. 26 (4). P. 417–426.
3. Maslakova A. A., Prusakov K. A., Sidorova A. E. et al. Pressure-driven sample flow through an electrospun membrane increases the analyte adsorption // *Micro*. 2023. Vol. 3 (2). P. 566–577.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-207

**ГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ОЛИГОДЕЗКОСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГ АДЕНИНА,
МОДИФИЦИРОВАННОГО ПО N6-ПОЛОЖЕНИЮ*****HYBRIDIZATION AND FLUORESCENCE PROPERTIES OF MODIFIED
OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING A N6-MODIFIED ADENINE**А. А. Пушкаревская^{1,2}, А. В. Аралов³, А. А. Ломзов^{1,2}¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*³*Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*А. А. Pushkarevskaya^{1,2}, А. В. Aralov³, А. А. Lomzov^{1,2}¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*³*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ lomzov@niboch.nsc.ru

Аннотация

Исследованы свойства олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих модифицированный по N6-положению аналог аденина. Определены термодинамические параметры формирования дуплексов, содержащих флуоресцентный нуклеозид, определен квантовый выход флуоресценции нуклеотида, содержащих его олигонуклеотидов и дуплексов. Продемонстрирован потенциал использования таких олигомеров в качестве флуоресцентных зондов.

Abstract

The properties of oligodeoxyribonucleotides containing an analog of N6-modified adenine studied. The thermodynamic parameters of duplexes formation containing a fluorescent nucleoside have been determined, and the fluorescence quantum yield of a nucleotide, oligonucleotides and duplexes containing it were determined. The potential of using such oligomers as fluorescent probes has been demonstrated.

Актуальной задачей современной биомедицины является разработка флуоресцентных зондов на основе модифицированных олигонуклеотидов, которые можно использовать для создания биосенсорных систем молекулярной диагностики инфекционных и генетических заболеваний. Перспективным подходом является введение в структуру олигонуклеотида флуоресцентной химической модификации гетероциклического основания. При этом важно сохранить способность модифицированного основания образовывать водородные связи с комплементарными основаниями в ДНК и РНК. Разработка олигонуклеотидных аналогов, значительно изменяющих свою флуоресценцию при формировании комплекса с комплементарной цепью нуклеиновых кислот, является одним из важных направлений создания молекулярных зондов.

Целью данного исследования является изучение физико-химических свойств олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН), содержащих аналог аденина, модифицированный по N6-положению, для оценки его перспективности в качестве элемента зондов для флуоресцентной детекции однонуклеотидных замен в нуклеиновых кислотах.

В качестве модельного объекта исследования были выбраны 10-звенные ОДН, содержащие один модифицированный остаток, их свойства были сравнены с аналогичными немодифицированными ОДН. С помощью оптической спектрометрии и гравиметрии был определен коэффициент молярной экстинкции модифицированного нуклеотида. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала была изучена зависимость эффективности комплексообразования модифицированного олигонуклеотида с комплементарными цепями в зависимости от его фланкирующих оснований (рассмотрено 16 вариантов). Для олигонуклеотидов, содержащих тринуклеотиды вида XA^mY (где X, Y — A, G, C, T; A^m — N6-модифицированный аденозин), была изучена термостабильность их комплексов с комплементарными, содержащими напротив модификации нуклеотидные несоответствия. Показано, что введение модификации снижает термическую стабильность ДНК-дуплексов. Наибольшая

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7.
© А. А. Пушкаревская, А. В. Аралов, А. А. Ломзов, 2023

дестабилизация наблюдается для комплексов, в которых X и Y — пиримидиновые основания. Термостабильность комплексов с однонуклеотидными несоответствиями падает в ряду оснований C > T > G > A, находящихся напротив модификации.

Изучены спектры флуоресценции и определен квантовый выход флуоресценции модифицированного нуклеозида в свободном виде, в составе модифицированных ОДН и их комплексов с комплементарной цепью. Показано, что при образовании дуплекса наблюдается увеличение квантового выхода флуоресценции в сравнении со свободным нуклеозидом, причем величина изменения зависит от фланкирующих и находящегося напротив оснований.

Таким образом, исследованы гибридизационные и флуоресцентные свойства ОДН, содержащих предложенную нами модификацию. Результаты, полученные в данной работе, будут использованы для разработки систем молекулярной диагностики.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-208

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ S100P И S100A6
С ЧЕТЫРЕХСПИРАЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ*****INTERACTION OF S100P AND S100A6 PROTEINS
WITH THE FOUR-HELICAL CYTOKINES**

В. А. Растрьгина¹, А. С. Казаков¹, Е. И. Дерюшева¹, А. С. Соколов¹,
М. Е. Пермякова¹, Е. А. Литус¹, В. Н. Уверский^{1,2}, Е. А. Пермяков¹, С. Е. Пермяков¹

¹Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пушкино
²Отделение молекулярной медицины и Институт изучения болезни Альцгеймера им. Берда,
Университет Южной Флориды, Тампа

V. A. Rastrygina¹, A. S. Kazakov¹, E. I. Deryusheva¹, A. S. Sokolov¹,
M. E. Permyakova¹, E. A. Litus¹, V. N. Uversky^{1,2}, E. A. Permyakov¹, S. E. Permyakov¹

¹Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

²Department of Molecular Medicine and Byrd Alzheimer's Research Institute, University of South Florida, Tampa

✉ certusfides@gmail.com

Аннотация

Недавние исследования выявили способность белков S100 влиять на клеточную сигнализацию посредством прямого взаимодействия с цитокинами. В данной работе рассматривается взаимодействие промискуитетных представителей семейства белков S100 со множеством четырехспиральных цитокинов. Было установлено связывание *ca* 71/73 % изученных цитокинов с белками S100P/S100A6 соответственно.

Abstract

Recent studies have revealed the ability of S100 proteins to affect cell signaling via direct interaction with cytokines. This work considers interaction of promiscuous representatives of S100 protein family with numerous four-helical cytokines. The binding of *ca* 71/73 % of the studied cytokines to S100P/S100A6 proteins respectively was established.

Семейство белков S100 насчитывает свыше 20 структурно гомологичных, но функционально различающихся регуляторных кальций/цинк-связывающих белков позвоночных. Участие белков S100 в многочисленных жизненно важных (пато)физиологических процессах опосредуется их взаимодействием с различными внутри- или внеклеточными белковыми партнерами, включая поверхностные клеточные рецепторы RAGE, TLR4, ErbB1, ErbB3, ErbB4, IL-10R, integrin β 1, neuropilin- β , 5-HT_{1B}, 4-HT₄, SIRT-1, ALCAM, EMMPRIN, CD33, CD36, CD68, CD69, CD146 [1, 2]. Недавние исследования выявили способность белков S100 влиять на клеточную сигнализацию посредством прямого взаимодействия с цитокинами [3–5]. Мы изучили сродство 32 цитокинов человека из всех семейств четырехспиральных цитокинов к Ca²⁺-загруженной форме белка S100P человека методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Белок S100P связывает 22 цитокина с равновесными константами диссоциации K_d в диапазоне от 1 нМ до 3 μ М (рис. 1). Мы также изучили сродство 35 четырехспиральных цитокинов, охватывающих все структурные семейства этого суперсемейства, к Ca²⁺-насыщенной форме белка S100A6 (идентичность аминокислотной последовательности белку S100P составляет 35 %) методом ППР. S100A6 распознает 26 цитокинов из всех семейств этого фолда с величинами K_d от 0,3 нМ до 12 μ М (см. рис. 1). Таким образом, белки S100P/S100A6 узнают *ca* 71/73 % четырехспиральных цитокинов, изученных на сегодняшний день. Селективность взаимодействия обоих белков с цитокинами эквивалентна, за исключением связывания IL-2 и онкостатина-М.

Методом молекулярного докинга (сервер ClusPro [6]) мы предсказали наличие у белка S100P центра связывания цитокинов, перекрывающегося с центром связывания рецептора RAGE (рис. 2), что подтверждается исследованием взаимодействия мутантных форм белка S100P (F89A и Δ 42–47) со S100P-специфичными цитокинами. Аналогичный анализ белка S100A6 также свидетельствует о наличии в молекуле белка центра связывания цитокинов, аналогичного центру, обнаруженному в белке S100P (см. рис. 2).

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00289-П.

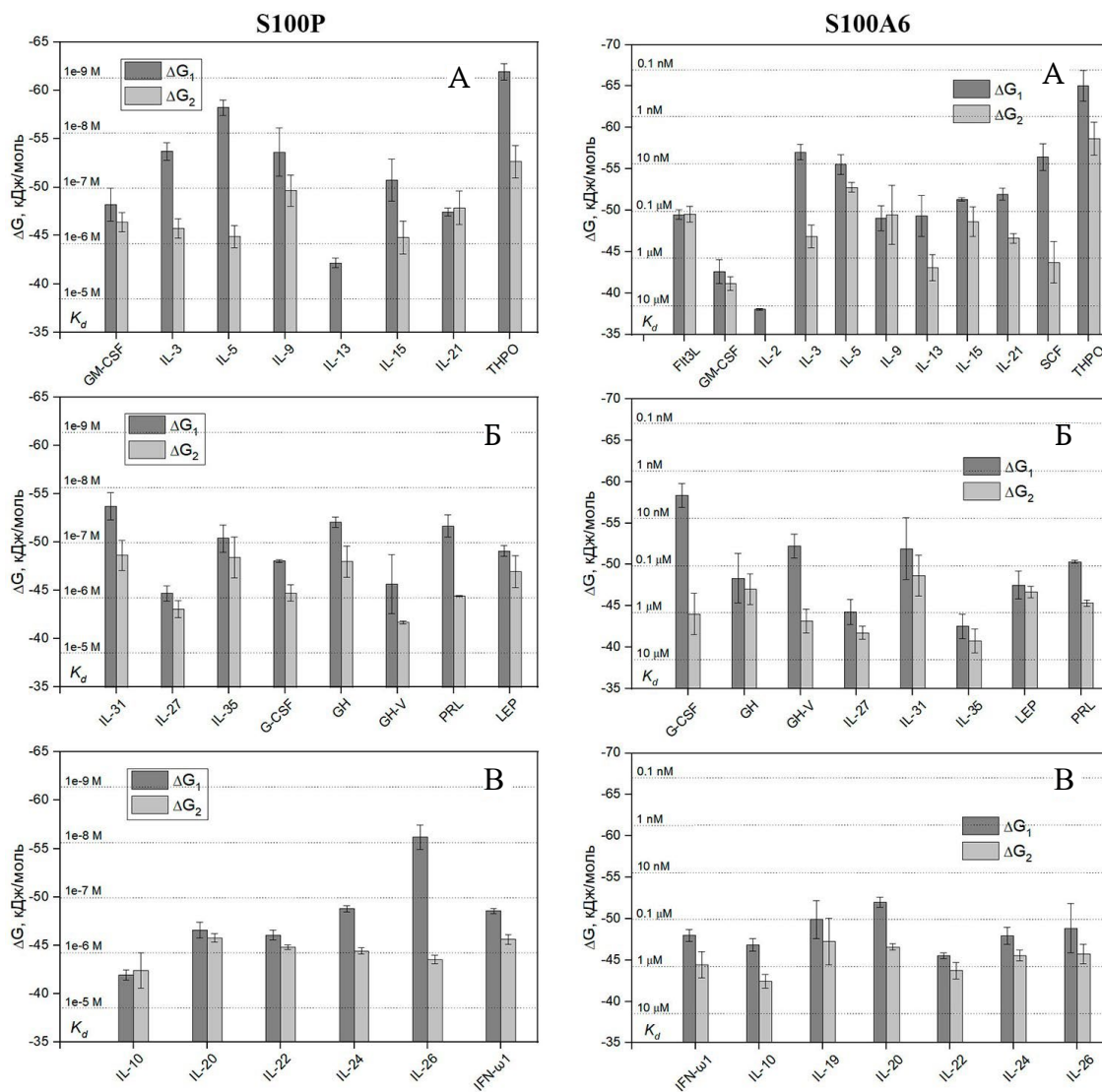


Рис. 1. Изменение свободной энергии при связывании Ca^{2+} -загруженного S100P/S100A6 с короткоцепочечными (А), длинноцепочечными (Б) цитокинами или интерферонами/IL-10 (В) при 25 °С, согласно данным ППР. $\Delta G_i = -RT \ln(55,3/K_{d,i})$, $i = 1, 2$. Указана шкала величин K_d

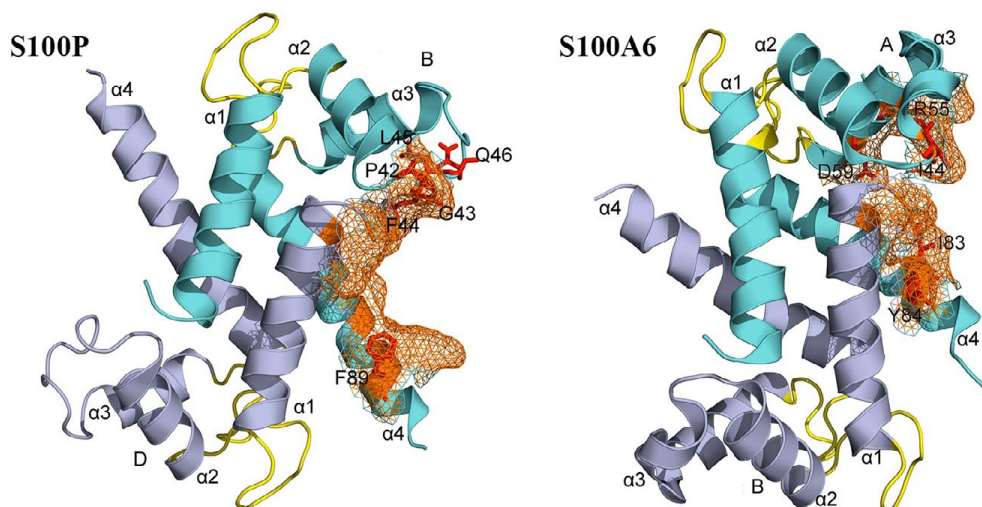


Рис. 2. Третичные структуры Ca^{2+} -загруженных димеров S100P/S100A6 (записи PDB 2MJW/1K9K): цепи В и D/А и В выделены голубым и серым соответственно; α -спирали обозначены как $\alpha 1$ – $\alpha 4$; Ca^{2+} -связывающие петли выделены желтым. Остатки, формирующие центр связывания цитокинов, показаны в виде оранжевой сетки; остатки, по прогнозам взаимодействующие по меньшей мере с половиной цитокинов, отмечены красным

Полученные данные свидетельствуют о наличии у некоторых промискуитетных представителей семейства белков S100 центра связывания, специфичного к широкому спектру четырехспиральных цитокинов. Эта уникальная особенность белков S100 потенциально позволяет им служить универсальными ингибиторами передачи сигналов четырехспиральных цитокинов, что позволяет снижать тяжесть нарушений в организме, сопровождающихся чрезмерным высвобождением цитокинов.

Литература

1. Sreejit G., Flynn M. C., Patil M. et al. S100 family proteins in inflammation and beyond // *Advances in Clinical Chemistry*. 2020. Vol. 98. P. 173–231.
2. Kazakov A. S., Deryusheva E. I., Permyakova M. E. et al. Calcium-Bound S100P Protein Is a Promiscuous Binding Partner of the Four-Helical Cytokines // *International journal of molecular sciences*. 2022. Vol. 23.
3. Kazakov A. S., Sokolov A. S., Permyakova M. E. et al. Specific cytokines of interleukin-6 family interact with S100 proteins // *Cell Calcium*. 2022. Vol. 101. P. 102520.
4. Kazakov A. S., Deryusheva E. I., Sokolov A. S. et al. Erythropoietin Interacts with Specific S100 Proteins // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12. P. 120.
5. Kazakov A. S., Sofin A. D., Avkhacheva N. V. et al. Interferon Beta Activity Is Modulated via Binding of Specific S100 Proteins // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21. P. 9473.
6. Desta I. T., Porter K. A., Xia B. et al. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking // *Structure*. 2020. Vol. 28. P. 1071–1081.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-209

**РИБОКСИН (ИНОЗИН) И ХЛОРОФИЛЛИН
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАДИОЗАЩИТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ*****RIBOXIN (INOSINE) AND CHLOROPHYLLIN AS PROMISING RADIOPROTECTIVE DRUGS**

Л. А. Ромодин, О. В. Никитенко, Т. М. Бычкова, Ю. А. Зрилова

Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна ФМБА России, Москва

L. A. Romodin, O. V. Nikitenko, T. M. Bychkova, Yu. A. Zrilova

Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, FMBA of Russia, Moscow

✉ rla2904@mail.ru

Аннотация

В настоящем исследовании определено, что важную роль в механизме ранее показанного радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла играет подавление реакций перекисного окисления липидов. Впервые была проведена методологически верная сравнительная оценка радиопротекторных свойств рибоксина (инозина) и эталонного радиопротектора индралина (Б-190) по тесту 30-дневной выживаемости мышей.

Abstract

In the present study, it was determined that the suppression of lipid peroxidation reactions plays an important role in the mechanism of the previously shown radioprotective effect of drugs based on chlorophyll. For the first time, a methodologically correct comparative assessment of the radioprotective properties of riboxin (inosine) and the reference radioprotector indralin (B-190) was carried out according to the 30-day survival test of mice.

Тематика разработки радиозащитных препаратов не утратила своей актуальности. Во многом это связано с химической токсичностью известных эффективных радиопротекторов. Поэтому активно ведется поиск нетоксичных радиозащитных препаратов, где внимание уделяется веществам, встречающимся в природе [1].

Однако отсутствие сведений о механизме радиозащитного действия данных препаратов затрудняет разработку их клинически приемлемых форм, а анализ их радиозащитных свойств усложнен по причине непроведения сравнения эффективности их действия с признанными радиопротекторами. Радиопротектором называют радиозащитный препарат, способный защитить организм при действии сверхлетальной дозы ионизирующего излучения непосредственно в момент облучения.

В литературе ранее сообщалось о наличии радиозащитных свойств у рибоксина (инозина — нуклеозида, содержащего гипоксантин) [2], и хлорофиллина (ХЛ, водорастворимого продукта омыления хлорофилла) [3–5]. Оба препарата обладают значительно более низкой токсичностью по сравнению с известными эталонными радиопротекторами, например, индралином (Б-190).

В ходе настоящего исследования методом регистрации хемилюминесценции было показано, что важную роль в механизме радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла играет подавление перекисного окисления липидов (ПОЛ). ХЛ подавлял ПОЛ в концентрациях от 1 мкМ.

Методом спектрофотометрии показано более высокое содержание ХЛ в лизате лимфоцитов, предварительно инкубированных в нем, по сравнению со средой инкубации, сделан вывод, что ХЛ способен поступать в цитоплазму клетки из межклеточной среды путем активного транспорта.

На основании того, что метод ДНК-комет не выявил достоверных генопротекторных свойств ХЛ для лимфоцитов, суспензия которых в течение часа инкубировалась в его растворе с последующим облучением рентгеновским излучением, и того, что ХЛ продемонстрировал их в клетках костного мозга [5] и сперматогониях [4] облученных мышей, сделано предположение, что ХЛ не проникает через ядерную мембрану из цитоплазмы в ядро клеток: его генопротекторные свойства в быстроделющихся клетках [4, 5] обусловлены разрушением кариолеммы при митозе, что обеспечивало попадание ХЛ в ядра дочерних клеток.

Радиозащитное действие ХЛ в радиочувствительных тканях, состоящих из быстроделющихся клеток, делает его перспективным радиозащитным средством.

* Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

© Л. А. Ромодин, О. В. Никитенко, Т. М. Бычкова, Ю. А. Зрилова, 2023

Также нами была впервые проведена методологически верная сравнительная оценка радиопротекторных свойств рибоксина и Б-190, эталонного радиопротектора, в дозах 100 мкг/г массы тела по тесту 30-дневной выживаемости самцов мышей (ICR CD-1, SPF), подвергнутых внешнему облучению рентгеновским излучением. Анализ выживаемости был проведен методом Каплана — Майера.

При облучении в дозе 6,75 Гр для обоих препаратов получено статистически значимое увеличение выживаемости: в контроле выжило 10 % мышей, при введении Б-190 — 95 %, рибоксина — 40 %. При дозе 6,5 Гр значимое отличие от контроля показал только Б-190: в контроле выжило 20 % мышей, при введении Б-190 — 100 %, рибоксина — 45 %.

Однако небольшой, по сравнению с Б-190, радиопротекторный эффект рибоксина компенсируется низкой его токсичностью. Кроме того, рибоксин, как и ХЛ, возможно использовать и в качестве радиомодулятора, применяемого уже после облучения для повышения сопротивляемости организма, в том числе и в комбинации с Б-190, вводимым до облучения, а также для нивелирования негативных последствий хронического облучения в малых дозах, с которым могут сталкиваться представители ряда профессий.

Литература

1. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M. S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective // *Current pharmaceutical biotechnology*. 2022. Vol. 23 (14). P. 1721–1738.
2. Гудков С. В., Гудкова О. Ю., Штаркман И. Н. и др. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2006. Т. 46 (6). С. 713–718.
3. Kumar S. S., Shankar B., Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo // *Biochimica et biophysica acta*. 2004. Vol. 1672 (2). P. 100–111.
4. Morales-Ramirez P., Mendiola-Cruz M. T. In vivo radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells // *Mutation research*. 1995. Vol. 344 (1–2). P. 73–78.
5. Morales-Ramirez P., Garcia-Rodriguez M. C. In vivo effect of chlorophyllin on gamma-ray-induced sister chromatid exchange in murine bone marrow cells // *Mutation research*. 1994. Vol. 320 (4). P. 329–334.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-210

АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОПОЛОГИИ РАКОВОГО, ЗДОРОВОГО И НЕПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЭПИТЕЛИЯ*

ANALYSIS AND MODELING OF THE TOPOLOGY OF CANCEROUS, HEALTHY AND NON-PROLIFERATIVE EPITHELIUM

Д. С. Рошаль¹, К. К. Федоренко¹, К. Аззаг², С. Б. Рошаль¹, С. Багдигян³¹Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону²Университет Миннесоты, США³Университет Монпелье, ФранцияD. S. Roshal¹, K. K. Fedorenko¹, K. Azzag², S. B. Roshal¹, S. Bagdighyan³¹Southern Federal University, Rostov-on-Don²University of Minnesota, USA³University of Montpellier, France

✉ rochal.d@yandex.ru

Аннотация

Анализируются топологические особенности эпителиальных монослоев с различной скоростью деления клеток на примере монослоев клеток HeLa, HCEpiC, COS, эпителия асцидий. Показано, что топологическая дефектность монослоя растет при увеличении скорости деления клеток. Проведено моделирование структуры и процессов роста эпителия.

Abstract

The topological features of epithelial monolayers with different rates of cell division are analyzed, using monolayers of HeLa, HCEpiC, COS cells, ascidian epithelium. It is shown that the topological defectiveness of the monolayer increases with an increase in the rate of cell division. Modeling of the structure and growth processes of the epithelia was carried out.

Эпителиальные ткани играют важную роль в жизнедеятельности организма, защищая внутренние органы от повреждений и транспортируя полезные вещества. Представление об эпителии как о разбиении плоскости на многоугольники существует уже несколько столетий. Однако до сих пор точно не ясно, как клеточная геометрия влияет на процессы роста и развития клеток, их переход между гиперпролиферативным состоянием, к которому относятся раковые и стволовые клетки, и нормальным пролиферативным состоянием. Цели данной работы — сравнение топологических особенностей непролиферативных, пролиферативных и гиперпролиферативных эпителиальных монослоев, а также моделирование структуры и процессов роста эпителия.

В ходе исследования проанализировано более 250 фотографий эпителиальных монослоев раковых (HeLa) [1] и здоровых (HCEpiC) клеток шейки матки человека, пролиферативных монослоев клеток эпителия почек обезьян (COS) и клеток непролиферативного эпителия, покрывающего яйца асцидий [2]. Написана программа, распознающая центры ядер клеток на фотографиях. Построены триангуляция Делоне (соединение центров ядер ближайших соседей) и разбиение Вороного, найдены распределения клеток по числу их соседей (рис. 1). Показано, что доля клеток с шестью соседями падает с ростом скорости деления клеток в монослое.

Также было проведено моделирование клеточной топологии. Был разработан алгоритм случайной упаковки клеток, где случайным образом распределялись точки (центры клеток) с минимально допустимым расстоянием между ними d_{min} (диаметр красных дисков на рис. 2). Если расстояние между точкой, которая в данный момент размещается, и любой из ранее размещенных точек меньше расстояния d_{min} , то эта точка удаляется и случайная вставка повторяется. Когда достигается желаемое число точек N , вставка прекращается. Оказалось, что модель случайных упаковок хорошо описывает топологию HeLa.

Для моделирования более упорядоченного пролиферативного и непролиферативного эпителия после случайного распределения точек с минимально допустимым расстоянием между ними производилась минимизация энергии упругой деформации монослоя (см. рис. 2), где N — число ячеек Вороного (клеток), A_i , A_i^0 и P_i — текущая и начальная площадь и текущий периметр i -й ячейки соответственно, S_{av} — средняя площадь клетки, P_{eff} —

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-72-00128.

эффективный средний периметр. Первый член в энергии связан с несжимаемостью клетки, а второй член ответствен за энергию «прилипания» клеток друг к другу и за силы поверхностного натяжения в оболочке клетки. Предложенные модели хорошо описывают реальные эпителии, показанные на рис. 2. Также проведено моделирование динамических процессов в эпителии, в том числе процессов митоза и апоптоза в монослоях клеток. Показано, что малая скорость этих динамических процессов заставляет колебаться топологические характеристики эпителия, а большая скорость деления или апоптоза может приводить к значительному уменьшению процента клеток с 6 соседями, то есть к увеличению дефектности эпителия.

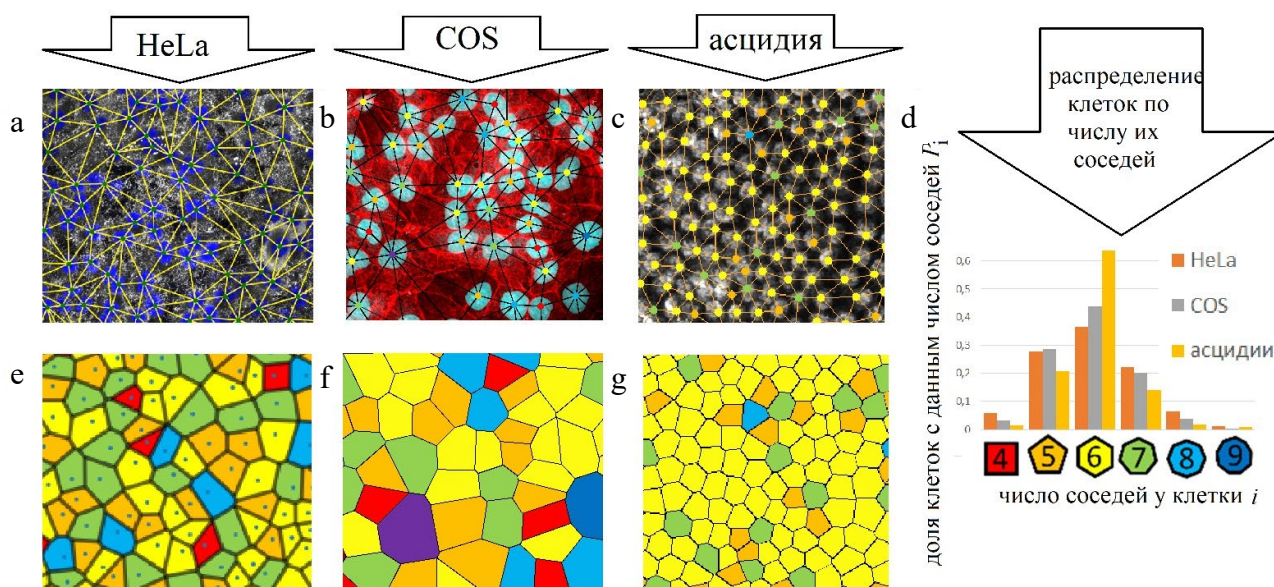


Рис. 1. Микрофотографии монослоев эпителия: HeLa (a, e), COS (b, f), асцидий (c, g), с наложенными триангуляцией Делоне (верхняя строчка) и разбиением Вороного (нижняя строчка)

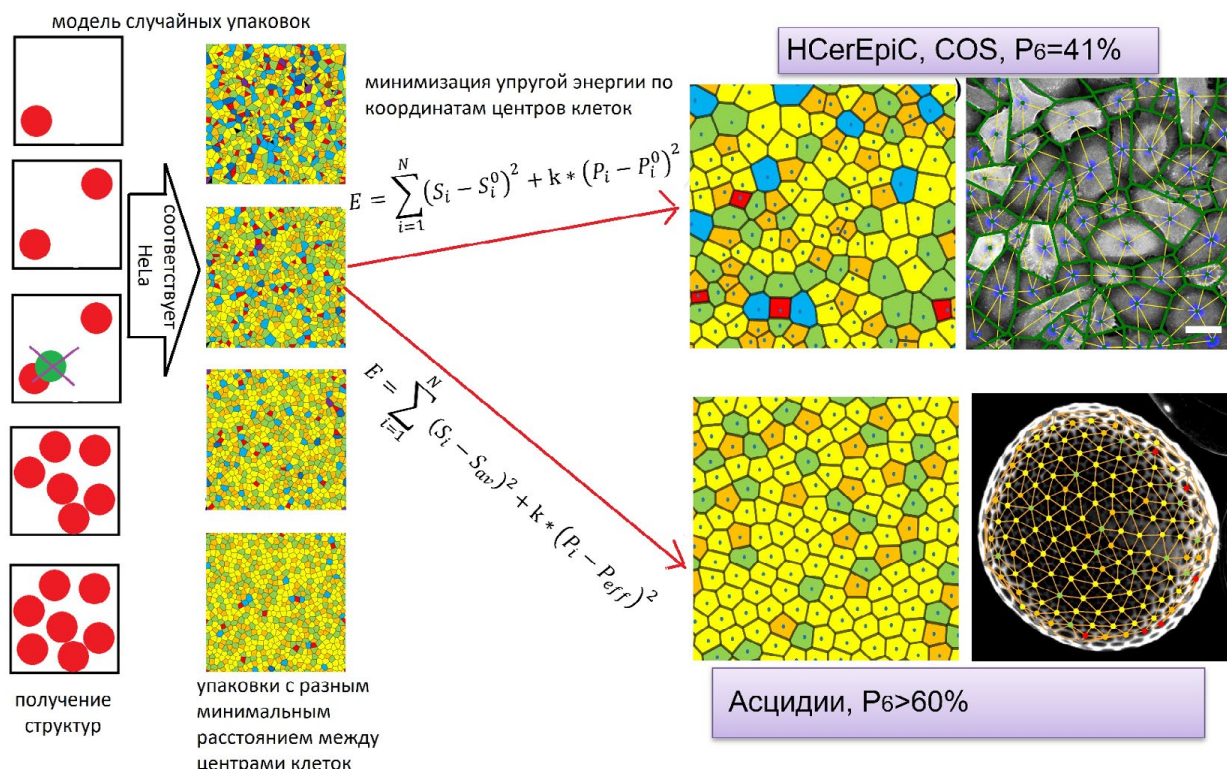


Рис. 2. Моделирование монослоев клеток HeLa, HCErEpiC, COS, оболочек икринок асцидий

Таким образом, в данной работе были рассмотрены особенности топологии монослоев клеток COS и HeLa, а также эпителия яиц асцидий. Полученные результаты могут быть использованы для изучения поведения эпителиальных клеток в нормальных и патологических условиях, что важно для понимания механизмов нарушения морфогенеза и старения в диагностике онкологических заболеваний.

Литература

1. Roshal D. S., Martin M., Fedorenko K. K. et al. Random nature of epithelial cancer cell monolayers // J. R. Soc., Interface. 2022. Vol. 19. P. 20220026.
2. Roshal D. S., Azzag K., Le Goff E. et al. Crystal-like order and defects in metazoan epithelia with spherical geometry // Sci. Rep. 2020. Vol. 10. P.1–11.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-211

**ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ GPCR
С АНТИТЕЛАМИ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ*****PREPARATION OF GPCR ANTIBODY COMPLEX SAMPLES FOR CRYO-ELECTRON MICROSCOPY**

А. А. Садова, Д. А. Дмитриева, Н. А. Сафронова, М. Б. Шевцов, Т. С. Куркин, В. И. Борщевский, А. В. Мишин

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

A. A. Sadova, D. A. Dmitrieva, N. A. Safronova, M. B. Shevtsov, T. S. Kurkin, V. I. Borshevskiy, A. V. Mishin

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ sadova.aa@phystech.edu

Аннотация

Рецепторы, сопряженные с G-белком, являются важнейшими терапевтическими мишенями, и их изучение представляет первостепенную задачу современной структурной биологии. Исследование структур GPCR сопряжено с многими трудностями, преодолеть которые может помочь образование комплексов рецепторов с фрагментами антител. В данной работе были получены 4 фрагмента антител, ранее успешно примененных для определения структур GPCR, которые в дальнейшем планируется использовать для получения структур рецепторов, исследуемых в нашей лаборатории.

Abstract

G-protein-coupled receptors are extremely important therapeutic targets, and their study represents the primary task of modern structural biology. Obtaining GPCR structures is fraught with many difficulties, which can be overcome by the formation of receptor and antibody fragments complexes. In this work, we obtained 4 antibody fragments, previously successfully used for the determination of GPCR structures, which we plan to use in the future to solve structures of the receptors studied in our laboratory.

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G-protein coupled receptors, GPCR) — наиболее широкий класс мембранных рецепторов, насчитывающий около 800 представителей, принимающих участие в регуляции многих физиологических процессов в организме. Структурная биология GPCR является актуальной и быстро развивающейся областью биофизики. Структурные исследования GPCR играют первостепенную роль в изучении механизмов действия рецепторов, ускоряют и удешевляют разработку лекарств.

За последние годы, после появления прямых детекторов электронов и совершенствования методов обработки данных, резко возросла популярность криоэлектронной микроскопии мембранных белков. Криоэлектронная микроскопия, в отличие от рентгеновской кристаллографии, требует гораздо меньших концентраций белка, а также, как правило, позволяет избежать длительного дизайна белковых конструкций для повышения выхода и стабилизации белка. Однако микроскопия имеет свои недостатки, главным из которых является ограничение снизу по массе исследуемых частиц — около 100 кДа, в то время как масса большинства GPCR не превышает 50 кДа. Поэтому для успешного получения данных на криоэлектронном микроскопе необходимо увеличить массу рецептора, например, с помощью образования комплекса с другими большими молекулами. При изучении активных конформаций исследуют комплексы GPCR с G-белками, а для неактивных форм были разработаны специальные белки-партнеры — фрагменты антител.

В данной работе исследуются различные комплексы GPCR и фрагментов антител: нанотел и Fab-фрагментов. Комплекс стабилизирующего нанотела Anti-FabNb [1] и Fab-фрагмента Bag2 [2] соединяется с популярным для GPCR фьюжн-партнером BRIL; соединение с рецептором через фьюжн-партнер позволяет не вносить дополнительных изменений непосредственно в аминокислотную последовательность рецептора. Комплекс фрагментов антител Nb6M-NabFab-Anti-FabNb [1, 3, 4], эпитопом которого является 3-я внутриклеточная петля капша-опиоидного рецептора, помещенная по гомологичным позициям в целевой рецептор, стабилизирует GPCR в неактивном состоянии. Оба комплекса за счет Anti-FabNb имеют жесткую пространственную структуру, что облегчает получение и обработку экспериментальных данных.

В ходе данной работы были проэкспрессированы и очищены фрагменты антител Nb6M, NabFab, Anti-FabNb и Bag2, были подтверждены их достаточные монодисперсность, степень очистки и взаимодействие. Ком-

* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (договор № 075-03-2023-106, проект № FSMG-2020-0003).

плексы фрагментов антител и рецепторов после надлежащей подготовки и доочистки были заморожены на сетках и исследованы на криоэлектронном микроскопе. В настоящий момент ведется работа по обработке экспериментальных данных, а также по совершенствованию условий подготовки образцов.

Литература

1. Ereño-Orbea J. et al. Structural basis of enhanced crystallizability induced by a molecular chaperone for antibody antigen-binding fragments // *Journal of Molecular Biology*. 2018. Vol. 430, iss. 3.
2. Mukherjee S. et al. Synthetic antibodies against BRIL as universal fiducial marks for single-particle cryoEM structure determination of membrane proteins // *Nature Communications*. 2020. Vol. 11, iss. 1.
3. Robertson M. J. et al. Structure determination of inactive-state GPCRs with a universal nanobody // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2022. Vol. 29, iss. 12.
4. Bloch J.S. et al. Development of a universal nanobody-binding Fab module for fiducial-assisted cryo-EM studies of membrane proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021. Vol. 118, iss. 47.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-212

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА В КЛЕТКАХ *IN VITRO* МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПАЦИЕНТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГИПОКСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ МИКРОСКОПИИ*

ASSESSMENT OF CHANGES IN METABOLIC STATUS IN *IN VITRO* CELLS OF A PATIENT'S GLIOBLASTOMA MODEL UNDER EFFECT OF HYPOXIA USING FLUORESCENT TIME-RESOLVED MICROSCOPY

Д. А. Сачкова^{1,2}, М. В. Ширманова¹, Г. М. Юсубалиева³,
А. В. Изосимова^{1,2}, А. М. Можеров¹, В. П. Баклаушев³, Д. В. Южакова¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

²Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

³Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва

D. A. Sachkova^{1,2}, M. V. Shirmanova¹, G. M. Yusubalieva³,
A. V. Izosimova^{1,2}, A. M. Mozherov¹, V. P. Baklaushev³, D. V. Yuzhakova¹

¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod

²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

³Federal Research and Clinical Center, FMBA of Russia, Moscow

✉ sachkova.collins@gmail.com

Аннотация

Изучение особенностей влияния гипоксии на устойчивость глиобластомы к различным видам противоопухолевой терапии важно для понимания механизмов резистентности в ответ на лечение. Использование пациент-специфических моделей глиобластомы пациентов в совокупности с инновационным методом FLIM-имиджинга может дать полезную информацию о наличии метаболических изменений в клетках опухоли после воздействия терапии.

Abstract

Studying the features of the effect of hypoxia on the resistance of glioblastoma to various types of antitumor therapy is important for understanding the mechanisms of resistance in response to treatment. The use of patient-specific models of patients' glioblastoma in combination with the innovative FLIM imaging method can provide useful information about the presence of metabolic changes in tumor cells after exposure to therapy.

Хроническая гипоксия, развивающаяся в процессе роста глиобластомы, является одним из ключевых факторов развития устойчивости к противоопухолевой терапии. Гипоксия приводит к увеличению активности гликолиза в клетках, что связано с развитием резистентности к разным видам терапии. Для получения новых знаний о влиянии гипоксичных условий на резистентность глиобластомы требуется разработка оптимальной пациент-специфической модели опухоли, которая позволяла бы проводить адекватную оценку метаболических сдвигов в клетках *in vitro* при воздействии терапии.

Инновационным подходом для исследования метаболического статуса опухолевых клеток может выступать флуоресцентная время-разрешенная микроскопия (FLIM) на основе анализа времени жизни флуоресценции метаболических кофакторов никотинамидадениндинуклеотид(фосфат) НАД(Ф)Н в свободном и связанном с белками состоянии.

Цель данной работы — оценка изменения метаболического статуса в клетках модели *in vitro* глиобластомы пациента под воздействием гипоксии с использованием FLIM-имиджинга кофакторов НАД(Ф)Н.

Объектами исследования выступали 2D и 3D клеточные модели глиобластомы, созданные из первичных культур глиобластомы пациентов (астроцитомы Grade IV). Первичные культуры выделяли путем механической дезагрегации и культивирования мелких фрагментов опухоли. Гипоксичные условия достигались понижением концентрации O₂ в атмосфере до 3,5 % и стандартным 5%-м содержанием CO₂. Визуализацию времени жизни флуоресценции метаболического кофактора НАД(Ф)Н осуществляли с использованием конфокального микро-

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-64-00057.

скопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM приставкой на основе время-коррелированного счета одиночных фотонов TCSPC (Becker & Hickl, Германия), возбуждение 375 нм, прием 435–485 нм.

На первом этапе с помощью FLIM-имиджинга установлено, что оптимальной моделью для исследований метаболических сдвигов при гипоксии является модель 3D сфероидов. Показано, что 2D клеточные культуры не демонстрировали переключения метаболизма в сторону гликолиза, при этом в некоторых случаях был отмечен сдвиг в сторону окислительного фосфорилирования, что может быть связано с более легкой адаптацией к условиям культивирования и устойчивости к гипоксии. Для 3D сфероидов показано статистически значимое снижение среднего времени жизни флуоресценции τ_m и вклада связанной с белком компоненты НАД(Ф)Н α_2 в «зрелых» (7-й день культивирования) сфероидов в условиях гипоксии: $0,62 \pm 0,01$ нс и $20,6 \pm 0,1$ % в гипоксии, по сравнению с $0,65 \pm 0,01$ нс и $22,5 \pm 0,4$ % в нормоксии. Подобное снижение в параметрах τ_m и α_2 указывает на ожидаемое усиление гликолитического метаболизма. Таким образом, показано, что 3D модель глиобластомы пациентов адекватно имитирует состояние хронической гипоксии, характерной для опухоли в организме. Кроме того, обнаружено, что при культивировании сфероидов на питательной среде Human Plasma-like Medium (Gibco), имитирующей естественное микроокружение опухоли в организме, в клетках наблюдался более выраженный сдвиг к гликолизу, чем при использовании стандартной среды DMEM.

На втором этапе проведен пилотный эксперимент по оценке метаболического ответа опухолевых сфероидов на терапию с новыми CAR-EGFR NK-клетками в условиях разной степени оксигенации. Зафиксировано увеличение параметра α_2 в клетках сфероидов после сокультивирования с CAR-EGFR NK-клетками, которое может быть ассоциировано со сдвигом в сторону окислительного фосфорилирования и снижением пролиферативной активности опухолевых клеток. При этом в условиях нормальной оксигенации значения параметра α_2 возрастали более однородно во всех клетках сфероидов, тогда как в условиях с пониженным содержанием кислорода возрастание было менее выражено и имело более гетерогенный характер. Таким образом, продемонстрировано, что при воздействии гипоксии сфероиды слабее отвечают на терапию, что может объясняться увеличением резистентности клеток опухоли в гипоксичных условиях.

Разработка подхода для оценки влияния условий гипоксии на метаболический статус клеток глиобластомы с использованием метода FLIM способна выступать современной платформой для изучения механизмов устойчивости опухолевых клеток к терапии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-213

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВОЛН РЕЕНТРИ В НЕОДНОРОДНОЙ АНИЗОТРОПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ПОМОЩИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ПОТТСА***MODELING THE OCCURRENCE OF REENTRY WAVES IN A HETEROGENEOUS ANISOTROPIC CARDIAC TISSUE USING A MODIFIED POTTS MODEL**М. М. Слотвицкий¹⁻³, С. А. Романова¹, А. К. Бережной¹⁻³, А. И. Калинин¹, В. А. Цвеляя¹⁻³, К. И. Агладзе^{1,2}¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского³Альметьевский государственный нефтяной институтM. M. Slotvitskiy¹⁻³, S. A. Romanova¹, A. K. Berezhnoy¹⁻³, A. I. Kalinin¹, V. A. Tsvelaya¹⁻³, K. I. Agladze^{1,2}¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny²Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute³Almetyevsk State Oil Institute

✉ mikhail.slotvitskiy@phystech.edu

Аннотация

В данной работе мы предлагаем новый подход к *in silico* моделированию волн возбуждения в сердечной ткани: текстура сердечной ткани генерируется моделью Поттса и передается в электрофизиологическую модель. Из *in silico* экспериментов получена связь анизотропии и аритмогенности ткани. Доказано, что ослабление эфатической межклеточной связи увеличивает вероятность реентри, не влияя на скорость волны.

Abstract

Here, we propose a new approach to *in silico* modeling of excitation waves in cardiac tissue: the texture of cardiac tissue is generated by the Potts model and transferred to the electrophysiological model. From *in silico* experiments, a relationship between tissue anisotropy and arrhythmogenicity was obtained. It has been proven that the decrease of the ephatic intercellular coupling increases the probability of reentry without affecting the conduction velocity.

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных причин смертности среди взрослого трудоспособного населения в развитых странах. Особое положение среди таких заболеваний занимает сердечная фибрилляция. Нет однозначного объяснения, как происходит внезапный переход от нормального проведения волны возбуждения в сердце к хаотичному паттерну, характеризующему состояние фибрилляции. Однако одним из наиболее вероятных механизмов считается возникновение спиральных волн реентри — это такой волновой режим, когда одна и та же волна возбуждения проходит через определенный участок ткани несколько раз. Волны реентри могут считаться предвестниками фибрилляции, так как вращение спиральных волн приводит к рассинхронизации различных участков сердечной ткани, увеличению частоты сердечных сокращений и возникновению новых спиральных волн, что может привести к динамическому хаосу — фибрилляции. Для возникновения реентри необходимо наличие функциональной неоднородности в сердечной ткани — в идеально гомогенной ткани волновой режим всегда будет неизменным. Чтобы исследовать такие процессы *in silico*, нужна компьютерная модель, дополненная реалистичным описанием таких неоднородностей.

В данной работе мы впервые предлагаем принципиально новый подход к моделированию гетерогенной сердечной ткани, учитывающий клеточное строение ткани. Реалистичная текстура ткани генерируется модифицированной моделью Поттса, основываясь на морфологии предсердных кардиомиоцитов на основе данных конфокальной микроскопии. При этом различные домены (возбудимая клеточная мембрана, межклеточные щелевые контакты и места контакта клеточных мембран) описываются различными значениями диффузии, что учитывается при расчете распространения локального мембранного потенциала электрофизиологической моделью Courtemanche. При генерации ткани учитывается направление волокон в сердечной ткани, что позволяет получить анизотропию скорости проведения: скорость вдоль заданных волокон в полтора раза превышает скорость проведения поперек волокон. Разделение ткани на клетки-домены приводит к тому, что форма потенциала действия может варьироваться от клетки к клетке (при неизменном наборе проводимостей трансмембранных

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-74-01028.

ионных каналов), а также зависит от направления распространения волны (вдоль и поперек волокон). Сочетание этих эффектов создает динамическую неоднородность проводящей ткани и влияет на возникновение и поведение спиральных волн, что делает модель потенциальным инструментом для прогностического моделирования волн реентри.

Проведенные в рамках работы *in silico* эксперименты позволили обнаружить частоты стимуляции, на которых возможно возникновение волн реентри в окрестности острого геометрического препятствия в ткани (простейшая модель инфарктного рубца). Было показано, что расположение и ширина окна частот, при которых возможно возникновение и существование реентри, зависят от анизотропии ткани: если к возникновению волн реентри привел цуг волн, распространявшийся вдоль волокон, то окно частот будет значительно шире, но сдвинуто в область более высоких частот. Данный результат был проверен и подтвержден при помощи *in vivo* экспериментов на культуре неонатальных крысиных кардиомиоцитов, высаженных в виде монослоя на анизотропные полимерные подложки, полученные при помощи электроспиннинга. Также удалось сформулировать качественно новую гипотезу о роли эфатической межклеточной связи на стабильность волны возбуждения: ослабление эфатической связи может менять вероятность возникновения реентри без влияния на скорость или анизотропию проведения волны возбуждения. Полученные результаты могут быть полезны для фундаментального изучения механизмов возникновения аритмий, а также для разработки методов доклинического тестирования эффективности антиаритмиков на монослоях сердечных клеток со стандартным геометрическим препятствием (например, с использованием пациент-специфичных кардиомиоцитов, полученных дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-214

**ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ КАРКАСОВ, ФУНКЦИОналиЗИРОВАННЫХ
МАГНЕТИТОМ, НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ***

**THE EFFECT OF METAL-ORGANIC FRAMEWORKS FUNCTIONALIZED WITH MAGNETITE
ON THE BIOLUMINESCENT ENZYMATIC ASSAY SYSTEM**

Д. В. Смирных¹, Е. С. Сушко², А. Г. Кичеева², Н. С. Кудряшева^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Институт биофизики СО РАН, Красноярск

D. V. Smirnykh¹, E. S. Sushko², A. G. Kicheeva², N. S. Kudryasheva^{1,2}

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk

²Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk

✉ den.smirnih@yandex.ru

Аннотация

Проведен анализ ингибирующей способности трех железосодержащих координационных полимеров (MOF, Fe₃O₄-MOF и MOF-Fe₃O₄) с использованием биолуминесцентного ферментативного биотеста. Результаты показали нейтральность всех координационных полимеров и низкое содержание АФК нефункционализированных полимеров. Предполагается безопасная эксплуатация этих полимеров для локальной доставки лекарств в терапии онкологических заболеваний.

Abstract

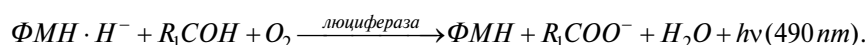
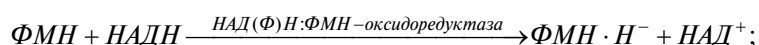
The inhibitory ability of three iron-containing coordination polymers (MOF, Fe₃O₄-MOF and MOF-Fe₃O₄) was analyzed using a bioluminescent enzymatic assay. The results showed the neutrality of all coordination polymers and a low ROS content of non-functional polymers. Safe operation of these polymers for local drug delivery in therapy of oncological diseases is assumed.

Наночастицы на основе железа (например, Fe₃O₄) считаются перспективными для использования при запуске реакций ферроптоза в раковых клетках. Для адресной доставки наночастиц можно использовать металлоорганические соединения (MOF), способные включать в себя достаточное количество наночастиц и быстро высвободить их. Важным является выявление биологической активности таких металлоорганических соединений, как координационные полимеры и их нанокомпозиты с оксидами железа, которые могут принимать участие в инициации гибели раковых клеток, но одновременно могут являться потенциальными токсикантами для биологических структур организма в процессе их адресной доставки.

Цель настоящей работы — выявление биологической активности координационных полимеров с использованием биолуминесцентной ферментативной тестовой системы.

В качестве тестовой системы для определения биологической активности все чаще применяют биотесты с использованием биолуминесцентных бактерий. При работе с биолуминесцентными биотестами удается проводить большое количество измерений, что является важным фактором для максимально точной статистической обработки и анализа данных, полученных в результате проведенных экспериментов. При мониторинге токсичности сред важным фактором является высокая чувствительность тестовой системы к действию различных веществ, подавляющих биологическую активность. Интенсивность люминесценции является тестовым физиологическим параметром жизнедеятельности бактерий.

В последнее время наиболее широко исследован и описан биотест, основанный на ферментативных реакциях люминесцентных бактерий, а именно биолуминесцентная система двух сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальными ферментами: НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой:



* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-73-10222.

© Д. В. Смирных, Е. С. Сушко, А. Г. Кичеева, Н. С. Кудряшева, 2023

Принципом люциферазных биотестов является изучение токсических свойств тестируемых смесей и веществ путем определения их влияния на ферментативные реакции биолюминесценции, так как в основе люминесцентных биотестов чаще всего лежит ингибирование бактериальных ферментов компонентами анализируемых смесей. Определение токсичности смеси происходит путем измерения изменения интенсивности биолюминесценции при наличии пробы в сравнении с контрольным образцом. Биолюминесцентный ферментативный биотест эффективен в работах, целью которых является определение ингибирующей способности биологически-активных веществ.

В работе проведено сравнение ингибирующей способности трех металлоорганических соединений: нефункционализованного MOF и двух MOF, функционализированных частицами магнетита с различным порядком введения компонентов: Fe_3O_4 -MOF и MOF- Fe_3O_4 . Для мониторинга ингибирующей способности использован ферментативный биолюминесцентный биотест НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза — люцифераза. Для изучения содержания активных форм кислорода (АФК) в водных растворах использовали хемилюминесцентный люминольный метод.

В результате биолюминесцентного тестирования было выявлено, что все три координационных полимера не подавляли или слабо подавляли интенсивность биолюминесценции ферментативной системы, что служит индикатором их нейтральности в биологических системах. Результаты хемилюминесцентного тестирования показали, что содержание АФК для нефункционализованного MOF в ферментативной системе в целом остается на уровне контроля на всем интервале концентраций MOF. Однако в то же время содержание АФК для функционализированных MOF достоверно ниже контрольного показателя при концентрациях выше 10^{-11} мг/л. Это указывает на сдвиг баланса потребления и производства АФК в биолюминесцентной ферментативной системе под действием магнетит-содержащих MOF, вероятно, в результате интенсификации редокс-процессов в присутствии Fe^{2+} и Fe^{3+} . Таким образом, из результатов экспериментов видно, что понижение концентрации АФК не приводит к заметному изменению интенсивности биолюминесцентной реакции в присутствии двух магнетит-содержащих координационных полимеров. Вероятно, такие колебания в содержании АФК не критичны для данного биохимического процесса и находятся в пределах возможности их балансирования.

На основе полученных данных можно сделать предположение о безопасной эксплуатации исследуемых координационных полимеров при локальной доставке лекарств в терапии онкологических заболеваний при запуске реакции ферроптоза.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-215

**ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛОМА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС OXYS —
МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА*****CHANGES IN THE OXYS RAT SERUM METABOLOM — A MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE**А. А. Смоленцев^{1,5}, О. А. Снытникова¹, Н. Г. Колосова¹, Д. В. Телегина², Ю. П. Центалович¹¹*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*²*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*³*Новосибирский государственный университет*A. A. Smolentsev^{1,5}, O. A. Snytnikova¹, N. G. Kolosova¹, D. V. Telegina², Yu. P. Tsentalovich¹¹*International Tomographic Center SB RAS, Novosibirsk*²*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*³*Novosibirsk State University*

✉ a.smolentsev3@g.nsu.ru

Аннотация

Метод ЯМР-спектроскопии применен для выявления метаболических предпосылок и маркеров развития болезни Альцгеймера (БА). В работе проведен сравнительный количественный анализ метаболитов сыворотки крови крыс OXYS — модели преждевременного старения, одним из проявлений которого становится развитие комплекса признаков БА.

Abstract

NMR spectroscopy is used to identify metabolic preconditions and markers for the development of Alzheimer's disease (AD). A comparative quantitative analysis of blood serum metabolites of OXYS rats, a model of premature aging, one of the manifestations of which is the development of a complex of AD signs, was carried out.

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 — 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 сыворотки крови 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 (4 месяцев) и активной прогрессии (16 месяцев). Крысы линии Wistar того же возраста были использованы в качестве контроля. Для 54 метаболитов сыворотки крови установлены диапазоны варьирования и средние значения концентраций.

Обнаружено, что метаболомный профиль сыворотки крови животных обеих линий существенно изменяется с возрастом. Для целого ряда метаболитов установлены значительные изменения в их концентрациях. В число этих метаболитов входят метионин сульфоксид, диметилглицин, ацетат, орнитин, изобутират, метионин, карнитин, цитидин, аскорбат и изолейцин. Анализ метаболических путей показал, что для обеих линий наибольшие изменения наблюдаются в метаболизме цистеина и метионина. В группах животных возраста 20 дней и 4 месяца линии OXYS наблюдается существенная разница в метаболическом пути биосинтеза убихинона и других терпеноидов-хинонов, участником которого является метаболит тирозин. Снижение концентрации тирозина

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-24-20035 и НСО р-37.

с возрастом у крыс OXYS, таким образом, может указывать на снижение антиоксидантной защиты, выполняемой убихиноном. Тирозин и включение активного биосинтеза тирозина можно рассматривать как потенциальный маркер развития болезни Альцгеймера. Сравнение метаболомных профилей сыворотки крови одновозрастных крыс обеих линий показало, что наиболее сильные различия наблюдаются в период манифестации и активной прогрессии БА. Анализ метаболических путей групп в возрасте 16 месяцев показал значимое различие в метаболизме глицеролипидов и галактозы, участником которых является метаболит глицерол. Биосинтез и деградация валина, лейцина и изолейцина также существенно отличаются.

Таким образом, изменения, наблюдаемые в метаболизме глицеролипидов, галактозы, а также валина, лейцина и изолейцина, могут свидетельствовать о развитии болезни Альцгеймера.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-216

КИНЕТИКА НАДФ(Н):ФМН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ, В ПРИСУТСТВИИ ГЛИЦЕРИНА И САХАРОЗЫ ***CONTRIBUTION OF NAD(P)H:FMN-OXIDOREDUCTASE ACTIVITY INTO VISCOUS MEDIUM EFFECTS ON KINETICS OF COUPLED ENZYME SYSTEM FROM LUMINOUS BACTERIA**О. С. Сутормин^{1,2}, Е. В. Немцева², Е. С. Тыртышная², Ю. Ю. Петрова¹, В. А. Кратасюк²¹*Сургутский государственный университет*²*Сибирский федеральный университет, Красноярск*O. S. Sutormin^{1,2}, E. V. Nemtseva², Y. S. Tyrtysnaya², Yu. Yu. Petrova¹, V. A. Kratasuyk²¹*Surgut State University*²*Siberian Federal University, Krasnoyarsk*

✉ sutormin_os@surgu.ru

Аннотация

В проведенном исследовании представлена информация о влиянии глицерина и сахарозы на кинетические характеристики НАДФ(Н):ФМН-оксидоредуктазы, выделенной из светящихся бактерий.

Abstract

This study examined the effects of glycerol and sucrose on the coupled reactions of NAD(P)H:FMN-oxidoreductase of luminous bacteria *in vitro*, providing valuable information regarding microenvironment of the enzyme and its function.

В настоящее время общепризнанным фактом является то, что внутренняя часть реального микроокружения клетки отличается от микроокружения, создаваемого с помощью стандартных буферных растворов. Изучение влияния агентов, изменяющих вязкость микроокружения, на ферментативную активность является актуальной темой исследований, посвященных механизмам устройства и организации внутриклеточного метаболизма. За последнее время были получены новые знания о механизмах и закономерностях поведения ферментов в присутствии различных краудинг-агентов и со-растворителей. Тем не менее до сих пор неизвестно, останутся ли закономерности влияния вязкого микроокружения на активность ферментов такими же, как и при исследовании моноферментной системы, в случае включения системы в цепочку метаболического пути.

Сопряженная биферментная система НАДФ(Н):ФМН-оксидоредуктаза + бактериальная люцифераза (Р + Л), выделенная из клеток светящихся бактерий, является уникальным исследовательским инструментом. Во-первых, активность как отдельных ферментов (Р и Л), так и сопряженной (Р + Л) системы легко контролировать без использования сложного оборудования. Во-вторых, активность Л в присутствии различных со-растворителей детально была изучена различными авторами. Однако на данный момент недостаточно данных о том, как присутствие со-растворителей, изменяющих вязкость реакционной среды, влияет на активность Р. В связи с этим целью данной работы является исследование кинетических характеристик Р в присутствии глицерина и сахарозы, симулирующих различные значения вязкости реакционной среды.

Полученные данные показывают, что активность Р снижается при увеличении вязкости реакционной среды. В присутствии глицерина снижение активности Р описывается в диффузионной-контролируемой манере. Влияние сахарозы на уменьшение активности Р не такое сильное, как у глицерина. Кроме того, было оценено влияние со-растворителей на K_m (ФМН) для Р. Было показано, что присутствие 20%-й сахарозы приводит к снижению значения K_m (ФМН) в 0,7 раза по сравнению со значением K_m (ФМН) в буфере. Отдельно стоит отметить, что присутствие 20%-го глицерина также ведет к увеличению величины K_m (ФМН), в 1,9 раза больше, чем для буферного раствора. Полученные изменения величин K_m (ФМН) в присутствии глицерина и сахарозы могут быть вызваны различными значениями относительной доступности используемых со-растворителей для активного центра Р [1]. Если сравнить активности Р, полученные в присутствии со-растворителей, с активностями Л [2] и Р + Л [3] систем, то можно сделать вывод о том, что влияние со-растворителей на активность сопряженной биферментной Р + Л системы близко к аддитивному. Таким образом, остаточная интенсивность биоломинесценции сопряженной биферментной системы Р + Л в присутствии глицерина и сахарозы близка к сумме индивидуальных эффектов

* Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 23-25-10039, <https://rscf.ru/project/23-25-10039/>.

© О. С. Сутормин, Е. В. Немцева, Е. С. Тыртышная, Ю. Ю. Петрова, В. А. Кратасюк, 2023

со-растворителей на кинетические характеристики как Р, так и Л. Исследование влияния со-растворителей на кинетику моноферментных реакций важно для понимания внутриклеточного поведения мультиферментных систем, например, в клетках светящихся бактерий.

Литература

1. Sukovatyi L.A., Lisitsa A.E., Kratasyuk V.A., Nemtseva E.V. The effect of osmolytes on the bioluminescent reaction of bacteria: structural and dynamic properties // *Biophysics*. 2020. Vol. 65. P. 966–971.
2. Lisitsa A.E., Sukovatyi L.A., Bartsev S.I. et al. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. P. 8827.
3. Sutormin O. S., Sukovataya I. E., Pande S., Kratasyuk V.A. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase // *Molecular Catalysis*. 2018. Vol. 458. P. 60–66.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-217

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА:
ДНКЖ С МЕРКАПТОСУКЦИНАТОМ, НИТРОЗОМЕРКАПТОСУКЦИНАТА;
И ДОНОРА КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ, НА-НИТРОПРУССИДА, НА КЛЕТКИ MCF-7

GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF NITRIC OXIDE DONORS: DNIC WITH
MERCAPTOSUCCINATE, NITROSOMERCAPTOSUCCINATE; AND A DONOR OF NITROSONIUM –
NA-NITROPRUSSIDE CATIONS ON MCF-7 CELLS

Н. Е. Трифонова¹, Е. И. Некрасова², В. А. Тронов¹

¹Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

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

N. E. Trifonova¹, E. I. Nekrasova², V. A. Tronov¹

¹Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow

²Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

✉ trifonova.n1991@gmail.com

Аннотация

Катионы нитрозония (NO^+) являются короткоживущими, поэтому мы выдвинули гипотезу о том, что они вызывают двунигетевые разрывы (ДР) ДНК на ранних этапах инкубации донора NO^+ с клетками. Методами МТТ и ДНК-комет на клетках рака молочной железы человека MCF-7 показано, что донор NO^+ нитропруссид натрия приводит к быстрым цито- и генотоксическим эффектам до включения в клетках репаративных процессов. МТТ-тест показал участие механизма NER-репарации в возникновении ДР и возможный вклад в генотоксическое действие NO^+ .

Abstract

Nitrosonium cations (NO^+) are short-lived, so we hypothesized that they cause double-strand (DS) DNA breaks in the early stages of incubation of the NO^+ donor with cells. By MTT-test and DNA-comet, methods on human breast cancer cells MCF-7 has been shown that the donor NO^+ sodium nitroprusside leads to rapid cyto- and genotoxic effects before the start of reparative processes in the cells. The MTT-test showed the involvement of the NER repair mechanism in the occurrence of DS and a possible contribution to the genotoxic effect of NO^+ .

В работе S. Khan 1997 г. на фибробластах Swiss 3T3 показано, что NO^+ , выделяемый донорами NO, значительно более цитотоксичен, чем оксид азота. Цитотоксичность NO^+ проявлялась в раннем апоптозе, прослеживаемом по изменению структуры митохондрий, формированию апоптотических телец, конденсации хроматина и межнуклеосомной деградации хроматина в клетках. Эти признаки проявлялись в клетках спустя 2 ч после воздействия Na-нитропрусида (SNP), донора NO^+ . В то время как апоптотическая гибель клеток Swiss 3T3, вызываемая NO и его донорами, наблюдалась не менее 24 ч после воздействия [1].

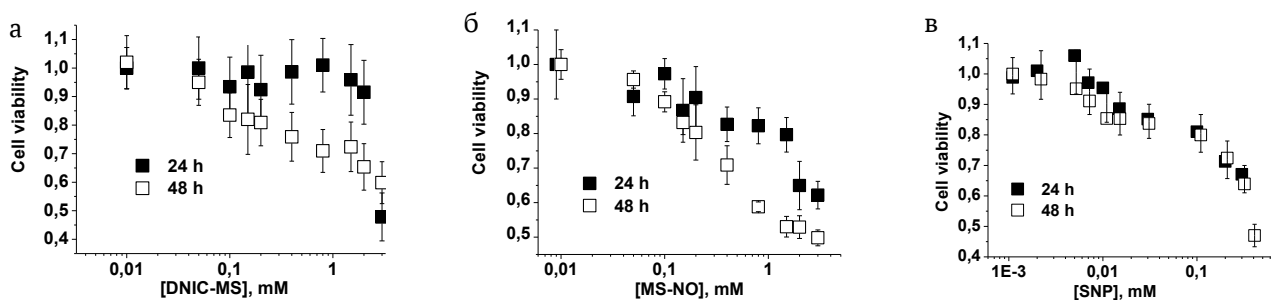
А. Ф. Ванин в статье 2022 г. указывает, что цитотоксический эффект ДНКЖ-комплексов в большой степени обусловлен NO^+ [2, 3]. Также NO^+ вызывают бактериостатическое действие ДНКЖ-GSH на клетки *E. coli* [4]. Была продемонстрирована противовирусная активность NO^+ в отношении SARS-COV-2 на модели сирийского хомячка [5]. В-DNIC-GSH и В-DNIC-MS оказывают цитотоксическое действие на клетки MCF7, опосредуются NO^+ , высвобождающимися из этих комплексов [6].

В. А. Троновым с соавт. в 2022 г. на клетках MCF-7 показано, что индуцированные комплексом ДНКЖ-МС (донором NO) однонигетевые разрывы (ОР) ДНК эффективно репарируются. Помимо ОР в клетках обнаруживались ДР ДНК, которые могли приводить к цитотоксическому эффекту. В качестве причины возникновения летальных ДР был предположен NER-механизм репарации NO-модифицированных оснований в ДНК [7]. Нельзя также исключить связь между возникновением ДР, продукцией NO^+ ДНКЖ-комплексами и цитотоксическим эффектом доноров NO.

В качестве доноров NO использовали нитрозомеркаптосукцинат (MS-NO) и биядерный комплекс ДНКЖ-Ж-меркаптосукцинат (DNIC-MS). Na-нитропруссид (SNP) использовали в качестве донора NO^+ .

Обнаруженный нами факт (см. рисунок) снижения цитотоксичности доноров NO при снижении времени их инкубации с клетками (достоверного в интервале доз агентов 0,12–1,2 mM) согласуется с предложением

о посреднической роли механизма репарации нуклеотидов NER в токсическом эффекте доноров NO [8]. Таким образом, гибель клеток при действии доноров NO ассоциирована с активным механизмом репарации NO-модифицированных нуклеотидов (NER) и ДР ДНК.



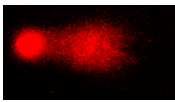
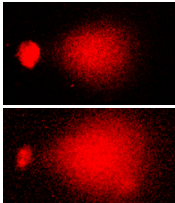
Ответ жизнеспособности клеток MCF-7 на инкубацию 24 ч и 48 ч с донорами NO:
а — DNIC-MS; б — MS-NO, с донором NO⁺; в — SNP

Совпадение ответов клеток на 24- и 48-часовые инкубации с SNP указывает на отсутствие вклада механизма репарации NER в цитотоксичность донора NO⁺. Цитотоксичность SNP более чем на порядок выше цитотоксичности исследованных нами доноров NO. С целью проверки этой гипотезы мы инкубировали клетки с SNP в течение 1,5 ч, после чего идентифицировали в их ДНК ДР, используя для этого метод нейтральных ДНК-комет.

Метод комет дает возможность оценить летальное событие в клеточной популяции по относительному количеству клеток, в которых уровень повреждения ДНК несовместим с жизнеспособностью. Была определена доля в популяции комет класса С4 (табл. 1), в который входят погибшие клетки и клетки с негативным прогнозом на выживаемость.

Таблица 1

Классы комет

Классы комет		Поврежденность dsДНК, mt	Повреждение
	C0–C1	0 < mt < 10	Нет
	C2	10 < mt < 20	Слабое–среднее
	C3	20 < mt < 40	Высокое
	C4	mt > 40	Гибель клетки

Результаты двух независимых экспериментов представлены ниже (табл. 2).

Интегральная флуоресценция комет (Mс) соответствует содержанию ДНК в клетке. Снижение показателя связано с гибелью клетки. Однако 1,5-часовая инкубация клеток с SNP (0,1 mM) не увеличивает долю клеток с Mс < 2000 по сравнению с долей таковых в интактной популяции. Значит, возникающие разрывы ДНК — следствие генотоксического действия SNP, а не ферментативной деградации, ассоциированной с апоптозом или некрозом. При этом доля клеток с сильно поврежденной ДНК (mt > 40) после инкубации с SNP возрастает до 24 %, по сравнению с 6 % таких клеток в интактной популяции. По результатам МТТ-теста доля нежизнеспособных клеток после 24- или 48-часовой инкубации с 0,1 mM SNP составляет 22 ± 4 %.

Таблица 2

Индукционное Na-нитропруссидом (100mkM, 90 min) повреждение dsДНК в клетках линии MCF-7

№	treat	pH	phores	dye	<mt> _{x40}	C4	<mt> _{x40}	C4	<mt> _{x40}	C4
1	Cntr	neu	20V/20min	PI	8,94 ± 21	3 %	14,5 ± 22,5	9,2 %	11,8 ± 22	6 %
3	snp	neu	20V/20min	PI	19,3 ± 40	12 %	30 ± 29	30,2 %	27 ± 33	24 %
					May 10, Protocol 4		Apr 24, Protocol 3		May + Apr	

Таким образом, донор катиона нитрозония Na-нитропруссид вызывает двунитевые разрывы в ДНК клеток MCF-7 в течение 90 мин совместной инкубации. Доля клеток, получающих при этом сильное (невосстанавливаемое) повреждение ДНК, составляет 24 % (по результатам 2 независимых экспериментов), что близко к доле нежизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста при 24 и 48-часовой инкубации (22 %).

Литература

1. Khan S., Kayahara M., Joashi U. et al. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation // J. Cell Sci. 1997. Vol. 110 (18). P. 2315–2322.
2. Ванин А. Ф. Позитивное (регуляторное) и негативное (цитотоксическое) действие динитрозильных комплексов железа на живые организмы // Биохимия. 2022. Т. 87 (11). С. 1739–1760.
3. Ванин А. Ф. Катионы нитрозония как наиболее эффективные в цитотоксикологическом отношении компоненты динитрозильных комплексов железа // Биофизика. 2022. Т. 67 (3). С. 434–443.
4. Ванин А. Ф., Телегина В. И., Микоян В. Д. и др. Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов // Биофизика. 2022. Т. 67. С. 938–946.
5. Шиповалов А. В., Ванин А. Ф., Пьянков О. В. и др. Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-COV-2 на модели сирийского хомячка // Биофизика. 2022. Т. 67 (5). С. 969–981.
6. Vanin A. F., Tronov V. A., Borodulin R. R. Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands (based on the experimental work on MCF7 human breast cancer cell culture) // Cell Biochem Biophys. 2021. Vol. 7. P. 93.
7. Тронов В. А., Ткачев Н. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Гено- и цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа с меркаптосукцинатом на клетки MCF-7 // Цитология. 2022. Т. 64 (5). С. 457–465.
8. Тронов В. А., Ткачев Н. А., Некрасова Е. И., Ванин А. Ф. Гено- и цитотоксическое действие динитрозильного комплекса железа с меркаптосукцинатом на клетки MCF-7 // VII Съезд биофизиков России: сб. науч. трудов, Краснодар, 17–23 апреля 2023 г. Краснодар: Кубанский гос. техн. ун-т, 2023. Т. 2. С. 35–36.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-218

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ КАТИОННЫХ ПОРФИРИНОВ С АПТАМЕРОМ AS1411
МЕТОДАМИ ЭПР И ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ*****STUDY OF CATIONIC PORPHYRIN COMPLEXES WITH APTAMER AS1411
BY EPR AND OPTICAL SPECTROSCOPY**

Т. А. Хлынова, Н. Э. Санникова, О. А. Крумкачева

*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет*

T. A. Khlynova, N. E. Sannikova, O. A. Krumkacheva

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

✉ tomch1366@gmail.com

Аннотация

Порфирины являются фотосенсибилизаторами (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ). Однако наиболее эффективные ФС имеют низкую растворимость в воде, что ограничивает область их применения в ФДТ. Одним из решений данной проблемы является использование целевых средств доставки, например, олигонуклеотида AS1411. В данной работе было изучено взаимодействие катионных мезоарилпорфиринов с AS1411 с помощью оптической и дипольной ЭПР-спектроскопии.

Abstract

Porphyrins are photosensitizers (PS) for photodynamic therapy (PDT). However, the most effective PS have poor water solubility, which limits their application in PDT. The solution to this problem is the use of targeted drug delivery, such as the oligonucleotide AS1411. In this work we studied the interaction of cationic mesoarylporphyrins with AS1411 by optical and dipole EPR spectroscopy.

В настоящее время фотодинамическая терапия, основанная на использовании фотосенсибилизаторов, является одним из наиболее перспективных методов лечения онкологических заболеваний. Фотосенсибилизаторы — это фоточувствительные молекулы, которые при облучении переходят в возбужденное триплетное состояние, способное генерировать активные формы кислорода, в том числе наиболее реакционноспособный синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). В качестве ФС высокого квантового выхода ($^1\text{O}_2$) активно используются порфирины и их производные, имеющие ряд недостатков: склонность к агрегации в водных растворах и отсутствие селективности к раковым клеткам. Данные проблемы можно решить использованием целевых средств доставки.

AS1411 — это богатый гуанином олигонуклеотид ДНК, аптамер белка нуклеолина, обнаруженного в высоких концентрациях на поверхности раковых клеток. AS1411 способен образовывать различные G-квадруплексные структуры, четырехцепочечные спирали, где 4 гуаниновых основания образуют плоскую структуру, удерживаемую парными взаимодействиями двух гуанинов. Однако связывание ФС с G-квадруплексами может повлиять на свойства порфиринов, поэтому для создания новых эффективных ФС на основе G-ДНК необходимо понять механизм данного взаимодействия.

В данной работе были проведены исследования взаимодействия катионных мезо-арилпорфиринов с различной длиной боковых цепей и их металлокомплексов с олигонуклеотидом AS1411. В оптических спектрах был зарегистрирован крайне интересный эффект: при соотношении концентраций порфиринов и ДНК 3:1 наблюдается значительное увеличение способности поглощения света в длинноволновой области (650–700 нм). Для Zn-содержащих производных порфиринов аналогичный эффект не наблюдался. Для понимания природы данного эффекта была исследована структура комплекса с помощью дипольной ЭПР-спектроскопии. Было обнаружено, что образование комплекса с катионными порфиринами стабилизирует димерные структуры AS1411.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-73-10239.

© Т. А. Хлынова, Н. Э. Санникова, О. А. Крумкачева, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-219

**ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК СРЕДСТВО ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ
ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРОЦЕССОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АРИТМИЙ****TISSUE ENGINEERING AS A TOOL FOR RESEARCH AND DEVELOPMENT OF POTENTIAL
THERAPIES FOR THE PROCESSES OF ARRHYTHMIAS**В. А. Цвеляя¹⁻³, М. М. Слотвицкий¹⁻³, А. А. Аитова¹⁻³, С. А. Романова¹⁻³, К. И. Агладзе^{1,5}¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный²Альметьевский государственный нефтяной институт³Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. ВладимирскогоV.A. Tsvelaya¹⁻³, M.M. Slotvitsky¹⁻³, A.A. Aitova¹⁻³, S.A. Romanova¹⁻³, K.I. Agladze^{1,5}¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny²Almetyevsk State Oil Institute³Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute

✉ natdobryak@gmail.com

Аннотация

На данный момент существует множество споров о зависимости сердечно-сосудистых заболеваний от фенотипа сердечных клеток, получаемых на стадии формирования сердца и при его развитии за всю жизнь пациента. Одной из важных задач современной медицины можно считать сопоставление факторов, приводящих к патологическому фенотипу в зависимости от генотипа и вне зависимости от него. Данная работа представляет собой изучение формирования сердечной ткани и электрофизиологических свойств кардиомиоцитов в различных условиях, которые задают фенотипические проявления функциональных различий кардиомиоцитов в процессе созревания сердечной ткани *in vitro*.

Abstract

At the moment, there is a lot of controversy about the dependence of cardiovascular diseases on the phenotype of heart cells obtained at the stage of heart formation and during its development throughout the life of the patient. One of the tasks of modern medicine, therefore, can be considered a comparison of factors leading to a pathological phenotype, depending on the genotype and regardless of it. This work is a study of the formation of cardiac tissue and the electrophysiological properties of cardiomyocytes under various conditions that determine the phenotypic manifestations of functional differences in cardiomyocytes during the maturation of cardiac tissue *in vitro*.

Несмотря на значительный прогресс в областях медицины и генетики, сердечно-сосудистые заболевания остаются наиболее частой причиной смерти. Фундаментальными причинами остановки сердца при внезапной сердечной смерти, как правило, являются сбой прокачки крови и перегрузка сердца, вызванная неправильным проведением волны возбуждения миокардом с образованием спиральной волны — re-entry (ре-энтри). Основными сигналами к таким последствиям являются тахикардии, сердечные недостаточности и инфаркт миокарда [1]. Аритмия часто возникает как следствие неправильной работы ионных каналов, которая часто вызвана наследственной мутацией. Например, на данный момент известно более 1000 генетических замен в ~ 20 генах, которые ассоциируются с синдромом LQT [2]. Однако более распространенной является приобретенная аритмия, причинами которой могут быть неправильно подобранные лекарства, алкоголь и стресс. Предсказание и предотвращение такой аритмии являются целью современной мировой сердечной медицины. Индивидуальность аритмий, различия в экспрессии ионных каналов не позволяют выявить обобщенный механизм возникновения ре-энтри на сердечной ткани.

Для изучения аритмии было создано большое количество моделей, особенно после опубликованной в 2006 г. статьи [3] об индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ipsc). Модели на основе ipsc успешно используются для исследования влияния различных веществ, в том числе и на спиральные волны на монослойное желудочковых кардиомиоцитов, картирования линий с мутациями, моделирования каналопатий при помощи блокаторов ионных каналов [4]. Несмотря на то, что подобные работы в целом приближаются к пониманию того, как распространяется автоволна при нормальном проведении и в случае ре-энтри, этого недостаточно для ответа на ключевой вопрос — как происходит переход между нормальным режимом проведения и появлением спиральной волны [5].

Разнообразие каналопатий приводит к возникновению все новых антиаритмиков, тестирующихся на пациент-специфичных моделях, что зачастую приводит к неправильному их применению [6]. Также имеющиеся антиаритмики (бэтта-блокаторы) способны лишь снижать нагрузку на сердце в критических случаях, но не гарантируют невозможность образования ре-энтри. Ответ на вопрос о механизме образования ре-энтри поможет выявить принципиальные различия условий перехода к хаотическому проведению обычного желудочка и желудочка с мутациями. Также это поможет создать адекватную реалистичную модель для тестирования лекарственных средств и выявления патологий с численными эквивалентами аритмогенности сердечной ткани.

Для решения поставленной задачи мы предлагаем использование новой модели на основе тканевой инженерии — теста на аритмогенность, основанного на методе оптического картирования. Данный метод позволяет не только фиксировать скорость и направление фронта волны возбуждения (как при мультитектродном исследовании), но и при помощи камеры с высоким пространственно-временным разрешением детально изучить его поведение на неоднородностях монослоя клеток, таких как острые рубцы [7, 8]. В реальном сердце роль неоднородностей могут играть инфарктные рубцы фибробластов, нарушения межклеточных контактов, неправильное функционирование клеток, анизотропия и т. д. При этом они могут иметь случайную/спонтанную природу [9]. В данной модели учтен этот фактор, влияющий на вероятность возникновения ре-энтри, а именно неоднородность монослоя, с помощью фиксированного стандартного препятствия.

Следующим фактором, учтенным в данной работе, является электрофизиологическая зрелость клеток, зависящая от этапа направленной клеточной дифференцировки [10, 11]. Несмотря на большое количество работ, посвященных зрелости клеток, основанных на сравнении экспрессии характерных белков/факторов зрелого кардиомиоцита и кардиомиоцита из *ipsc*, функциональность кардиомиоцита и его ионных каналов после дифференцировки при разнообразии методов изучена мало. Наш тест может гарантировать соответствие электрофизиологии клеток из *ipsc* и реальных человеческих км, так как основан на регистрации потенциала действия и кальциевой динамики, что позволяет сравнивать результаты теста с реальными клиническими данными.

Имея такую систему скрининга на основе разработанной модели, можно качественно и численно изучить влияние таких факторов, как увеличение ЧСС и изменение в работе каналов, определить меру и характер влияния данных факторов на изменение аритмогенности. В данной работе представлено исследование механизма образования аритмий, определение индивидуальных временных рамок для исследования в соответствии с созреванием кардиомиоцитов после дифференцировки, что кардинально отличается от генотипических исследований. Представлено количественное определение аритмогенности культуры, а также различия в процессах образования аритмий на смоделированных патологиях.

Литература

1. El-Sherif N., Turitto G., Boutjdir M. et al. Electrophysiological basis of ECG characteristics of torsades de pointes in long QT syndrome // *Cardiac Electrophysiology Clinics*. 2014. Vol. 6 (3). P. 433–444.
2. Campuzano O. et al. Update on the Genetic Basis of Long QT Syndrome. 2017.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 663–676.
4. Kadota S. et al. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets // *European heart journal*. 2012. Vol. 34, № 15. P. 1147–1156.
5. Smith A. S. T., Macadangdang J., Leung W. et al. Human iPSC-derived cardiomyocytes and tissue engineering strategies for disease modeling and drug screening // *Biotechnology Advances*. 2017. Vol. 35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.002>.
6. Matsa E., Rajamohan D., Dick E. et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation // *European heart journal*. 2011. Vol. 32 (8), P. 952–962.
7. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer // *Toxicological Sciences*. 2019. Vol. 168, № 1. P. 70–77.
8. Podgurskaya A. D. et al. Cyclophosphamide arrhythmogenicity testing using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes // *Scientific reports*. 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–13.
9. Kléber A. G., Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias // *Physiological reviews*. 2004. Vol. 84 (2). P. 431–488.
10. Karakikes I., Ameen M., Termglinchan V., Wu J. C. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Insights into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes // *Circulation Research*. 2015. Vol. 117 (1). P. 80–88. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>.
11. Slotvitsky M. M. et al. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes // *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–11.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-220

**АНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДА Аβ (1-42) В ОБЛАСТИ АМИД I
МЕТОДОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ****ANALYSIS OF THE SECONDARY STRUCTURE OF Aβ (1-42) PEPTIDE
IN THE AMIDE I REGION BY RAMAN SPECTROSCOPY**А. А. Шутиков¹, Г. М. Арзуманян¹, К. З. Маматкулов¹, Е. Арынбек^{1,2}, Д. С. Закрытная¹¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна²Институт ядерной физики, Алматы, КазахстанA. A. Shutikov¹, G. M. Arzumanyan¹, K. Z. Mamatkulov¹, E. Arynбек^{1,2}, D. S. Zakrytnaya¹¹Joint Institute for Nuclear Research, Dubna²Institute of Nuclear Physics, Almaty, Kazakhstan

✉artyom.shutikov@nf.jinr.ru

Аннотация

Амилоидные фибриллы, обнаруженные в бляшках мозга при болезни Альцгеймера, состоят из пептидов бета-амилоид (Аβ). Пептиды Аβ образуются из трансмембранного белка-предшественника APP (amyloid precursor protein). Они имеют ярко выраженные фибриллогенные свойства, и его олигомеры являются токсичными для нервных клеток, вызывая их дегенерацию и гибель. Считается, что олигомерный амилоид (1-42) играет важную роль в нейродегенерации при болезни Альцгеймера.

В данной работе мы проанализировали конформационные трансформации пептидов Аβ (1-42), встроенных в мембранные миметики, методом рамановской спектроскопии. Главной целью научного исследования было изучение структурных изменений пептида, приводящих к формированию амилоидных олигомеров и фибриллов.

Abstract

Amyloid fibrils found in plaques in Alzheimer's disease (AD) brains are composed of amyloid-β peptides. Aβ peptides are formed from the transmembrane amyloid precursor protein (APP). They have pronounced fibrillogenic properties, and its oligomers are toxic to nerve cells, causing their degeneration and death. Oligomeric amyloid-β (1-42) is thought to play a critical role in neurodegeneration in AD.

In this work, we analyzed the conformational transformation of Aβ (1-42) peptides embedded in membrane mimetics by Raman spectroscopy. The main goal of the scientific study was to investigate the structural changes of the peptide leading to the formation of amyloid oligomers and fibrils.

Болезнь Альцгеймера — это нейродегенеративное и прогрессирующее заболевание, при котором повреждаются нейронные клетки головного мозга и ухудшаются когнитивные способности больных. В настоящее время изучение причин болезни Альцгеймера занимает важнейшее место в биофизических и биомедицинских исследованиях. Безусловно, данный патогенез еще не изучен до конца, однако многие исследования имеют ряд важных результатов. Считается, что одним из признаков заболевания является накопление амилоидных бляшек пептидов Аβ в мембранах нейронных клеток мозга человека [1]. Нейротоксичность основных компонентов пептидов Аβ может быть опосредована прямым взаимодействием между белками и липидными мембранами [2].

Данная работа посвящена изучению конформационных изменений пептида Аβ (1-42) в присутствии фосфолипидной системы — в миметиках, таких как липосомы и липодиски. Для более детального анализа липид-белкового взаимодействия был использован метод комбинационного рассеяния, который является неинвазивным, быстрым, мощным диагностическим инструментом, не требующим сложной подготовки и большого объема исследуемого материала [3]. В данной работе мы анализировали конформационные изменения чистого пептида Аβ со временем, в том числе в системе фосфолипидных мембран.

Целью нашего исследования было выяснение закономерности структурных изменений в области Амид I в рамановских спектрах пептидов, способствующих формированию амилоидных бляшек. В качестве фосфолипида для исследования был выбран полностью насыщенный фосфолипид ДМРС. Спектральный анализ выявил, что рамановский пик в области Амид I (1600–1700 см⁻¹) наиболее чувствителен к конформационным изменениям.

В результате работы было установлено, что растворенный в воде белок в отсутствие фосфолипидной системы склонен к агрегации. При добавлении пептида Аβ в процессе формирования липосом увеличивается ве-

роятность встраивания белка в липидный бислой. В такой системе белок переходит в более стабильную структуру: вторичная структура белка сохраняет α -helix конформацию. При добавлении пептида A β к сформированным липосомам уменьшается вероятность встраивания пептида в структуру бислоя, что приводит к формированию амилоидных фибрилл. В случае с липодисками, со встроенным пептидом A β , его структура меняется на β -turn конформацию. Полученные экспериментальные рамановские спектральные данные также подтверждаются результатами моделирования — молекулярной динамики.

Литература

1. Imanbekova M., Suarasan S., Rojalin T. et al. Identification of amyloid beta in small extracellular vesicles via Raman spectroscopy // *Nanoscale Adv.* 2021. Vol. 3. P. 4119–4132.
2. Accardo A., Shalabaeva V., Cotte M. et al. Amyloid β Peptide Conformational Changes in the Presence of a Lipid Membrane System // *Langmuir.* 2014. Vol. 30 (11).
3. Surovtsev N. V. Raman spectroscopy of phospholipid membranes // Сб. трудов конф. «International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT)». 2021. № 21. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/raman-spectroscopy-of-phospholipid-membranes>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-221

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА ИММУННЫХ КЛЕТОК***A PERSONALIZED APPROACH TO EVALUATE THE EFFICACY OF THE ANTITUMOR IMMUNOTHERAPY BASED ON METABOLIC IMAGING OF IMMUNE CELLS**Д. В. Южакова¹, А. В. Изосимова^{1,2}, Д. А. Сачкова^{1,2}, О. А. Ванцева²,
М. М. Сажина¹, А. Р. Кондратьева¹, А. М. Можеров¹, К. С. Яшин¹, М. В. Ширманова¹¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород²Нижегородский государственный университет им. Н. И. ЛобачевскогоD. V. Yuzhakova¹, A. V. Izosimova^{1,2}, D. A. Sachkova^{1,2}, O. A. Vantseva²,
M. M. Sazhina¹, A. R. Kondratieva¹, A. M. Mozherov¹, K. S. Yashin¹, M. V. Shirmanova¹¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ yuzhakova-diana@mail.ru

Аннотация

Ключевая проблема иммунотерапии опухолей связана с отсутствием надежных биомаркеров, позволяющих определять восприимчивость отдельных пациентов к лечению. Мы показали возможности метаболического FLIM-имиджинга иммунных клеток как для мониторинга раннего ответа на чекпойнт-терапию в ходе лечения, так и для прогнозирования ответа на чекпойнт-терапию для отдельных пациентов до начала лечения.

Abstract

A key problem in tumor immunotherapy is the lack of reliable biomarkers to determine the responsiveness of individual patients to treatment. We have shown the potential of metabolic FLIM imaging of immune cells to both monitor early response to checkpoint therapy during treatment and to predict response to checkpoint therapy for individual patients prior to treatment.

Ключевая проблема иммунотерапии опухолей связана с отсутствием надежных биомаркеров, позволяющих определять восприимчивость отдельных пациентов к лечению. Биомаркеры на основе автофлуоресценции метаболических коферментов иммунных клеток могут стать новым мощным предиктором ответа на лечение. А оптический метод флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM) на основе время-коррелированного счета фотонов является главным и наиболее востребованным подходом для регистрации времени жизни флуоресценции флуорофоров. Применение FLIM-имиджинга для исследования функционального состояния иммунных клеток является новой тенденцией. Валидация же метода FLIM для решения задачи оценки эффективности иммунотерапии выполнена впервые.

Мы показали возможности метаболического FLIM-имиджинга иммунных клеток как для мониторинга раннего ответа на чекпойнт-терапию в ходе лечения, так и для прогнозирования ответа на чекпойнт-терапию для отдельных пациентов до начала лечения. Мы апробировали данный подход на различных моделях.

На первом этапе осуществлялась оптимизация на модели мышины меланомы B16F0, одной из наиболее распространенных мишеней для иммунотерапии чекпойнт-ингибиторами. Установлено, что наиболее надежным оптическим маркером иммунного ответа на опухоль и терапию является относительный вклад свободной фракции НАДН $\alpha 1$. Известно, что его повышение связано со сдвигом в сторону гликолиза и глутаминолиза для поддержки повышенных потребностей активированных Т-клеток. Мы обнаружили, что $\alpha 1$ НАДН в активированных Т-клетках постепенно увеличивался по мере развития опухоли и достигал 71,3 % и 75 % в группах «Малая опухоль» и «Большая опухоль» соответственно, по сравнению с группой «Здоровые мышцы» (69,3 %). После иммунотерапии уровень $\alpha 1$ НАДН был выше в группе «Респондеры» с ингибированием роста опухоли (74,9 %), по сравнению с контрольной группой «Малая опухоль» (71,3 %) и группой «Нереспондеры» с прогрессирующей опухолью (71 %). Таким образом, оценка $\alpha 1$ НАДН в Т-клетках позволяет: 1) выявить реакцию иммунной системы на развитие опухоли; 2) различить ранние и поздние стадии онкогенеза ($p < 0,0001$); 3) выделить группы

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-74-10109.

ответивших и не ответивших на терапию ($p < 0,0001$). Кроме того, нарастающий иммунный ответ против опухоли отражает появляющийся вклад связанной формы НАДФН $\alpha 3$ у мышей в группе «Большая опухоль». Проточная цитометрия показала, что изменения фракции $\alpha 1$ -НАДФН коррелируют с активацией Т-клеток, тогда как изменения $\alpha 3$ -НАДФН коррелируют с пролиферацией.

На втором этапе мы рассматривали другой тип агрессивной опухоли — человеческую глиобластому, наиболее распространенную опухоль головного мозга со 100%-й смертностью. Иммунотерапия не включена в стандарт лечения глиом, однако в недавних исследованиях рассматривается как перспективный альтернативный вид лечения. Мы разработали оригинальную пациент-специфическую *in vitro* модель на основе фрагмента опухолевой ткани (эксплантата), сокультивируемого с лимфоцитами, выделенными из образца крови того же пациента. Для моделирования иммунотерапевтического воздействия к полученной системе добавляли анти-CTLA-4 и/или анти-PD-1 антитела и/или их комбинацию. Данная модель демонстрировала гетерогенный ответ как среди отдельных пациентов, так и среди разных видов лечения. В ряде случаев был достигнут положительный эффект, выражающийся в повышении относительного вклада свободной фракции НАДФН $\alpha 1$ (оценка по FLIM). Известно, что его повышение связано со сдвигом в сторону гликолиза и глютаминолиза для поддержки повышенных потребностей активированных Т-клеток. Данный эффект коррелировал с результатами стандартных измерений — значительным увеличением количества иммунных клеток и снижением количества опухолевых клеток (оценка методом фазово-контрастной микроскопии), активацией лимфоцитов и снижением индекса пролиферации опухолевых клеток (по данным проточной цитометрии).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-222

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЗВЕШЕННЫХ ГИСТОГРАММ*****STUDY OF THE HYBRIDIZATION PROPERTIES OF MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES
BY MOLECULAR DYNAMICS APPROACH USING THE WEIGHTED HISTOGRAM ANALYSIS METHOD**

И. И. Юшин, В. М. Гольшев, А. А. Ломзов

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

I. I. Yushin, V. M. Golyshev, A. A. Lomzov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ i.yushin@g.nsu.ru

Аннотация

Исследована применимость метода молекулярной динамики с анализом траектории методом взвешенных гистограмм для расчета термодинамических параметров формирования дуплексов производных нуклеиновых кислот с ДНК. В качестве объектов исследования были выбраны фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) и пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК). Показана высокая эффективность и достоверность прогностического расчета.

Abstract

The applicability of the molecular dynamics approach with trajectory analysis by the weighted histogram analysis method for calculating the thermodynamic parameters of duplexes formation of nucleic acid derivatives with DNA studied. Phosphoryl guanine oligonucleotides and peptide nucleic acids were objects of the study. High efficiency of predictive calculation is shown.

За последние несколько лет был разработан широкий спектр производных нуклеиновых кислот, часть из которых уже находит применение в качестве инструментов при решении разнообразных прикладных задач. Множество функциональных групп, вводимых в различные положения олигонуклеотидов, обеспечивает разнообразие физико-химических, молекулярно-биологических и других функциональных свойств. Одной из основных характеристик производных нуклеиновых кислот является их способность эффективно взаимодействовать с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот. Разработка подходов прогнозирования гибридных свойств производных нуклеиновых кислот необходима для рационального дизайна олигонуклеотидных конструкций и их эффективного применения.

В настоящее время перспективными методами изучения биополимеров являются методы компьютерного моделирования. Так, компьютерные методы расчетов позволяют проводить структурный анализ достаточно больших молекул и эффективно предсказывать их термодинамические параметры. Метод молекулярной динамики дает все более реалистичные результаты и все чаще применяется для *in silico* исследований свойств биополимеров.

В данной работе исследована возможность расчета энергии комплементарных ДНК/ДНК, ДНК/ФГО и ДНК/ПНК дуплексов различной длины и нуклеотидного состава с использованием метода взвешенных гистограмм (WHAM) при анализе траектории, полученной методом зонтичной выборки (umbrella sampling). Проведен анализ результатов моделирования в разных силовых полях при расчетах биомолекулярных систем в явной и неявной водной оболочках. Рассчитанные значения свободной энергии Гиббса при различных температурах использовали для вычисления энтальпийного и энтропийного вкладов в свободную энергию Гиббса формирования дуплексов. Используя величины ΔH° и ΔS° , рассчитывали температуру плавления комплексов ($T_{пл}$).

Используемый нами метод компьютерного моделирования показал высокую эффективность и достаточно высокую достоверность прогностического расчета. Наблюдается хорошая корреляция между термодинамическими параметрами, полученными с использованием метода WHAM и экспериментально.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.
© И. И. Юшин, В. М. Гольшев, А. А. Ломзов, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-223

INFLUENCE OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO BACTERIOPHAGE
ON PHAGE-THERAPY AND ANTI-BACTERIAL IMMUNITYL. Al Allaf^{1,2}, A. Chechushkov², T. Ushakova², V. Morozova², N. Tikunova²¹Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University²Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ allafina@gmail.com

Abstract

We demonstrated that although phage therapy with PM16 leads to the formation of anti-phage neutralizing antibodies in balb/c mice, it may boost the organism humoral response against its host, *p. mirabilis*. On the other hand, injecting balb/c mice with *p. mirabilis* increases the level of anti-PM16 antibodies, even in mice without previous encounter with PM16.

The effectiveness and safety of using bacteriophages as antibacterial therapy have come under investigation. Studies have reported the presence of anti-phage antibodies, and their capacity to neutralize phages depends on different factors [1, 2].

Current work sheds light on the effect of PM16 phage on the immune response formed against its host *Proteus mirabilis*, the formation of anti-PM16 neutralizing antibodies and its influence on the outcome of phage therapy.

Three groups of balb/c mice with different immunisation variants were used (Fig. 1). PM16 concentration used in the immunisation process was 10^9 PFU/mouse. After one month of the first immunisation, serum samples were collected and *P. mirabilis* 79 was/or wasn't administered, followed by a model of phage therapy using PM16 bacteriophage (See Fig. 1). Blood samples were also collected after two weeks of bacterial infection.

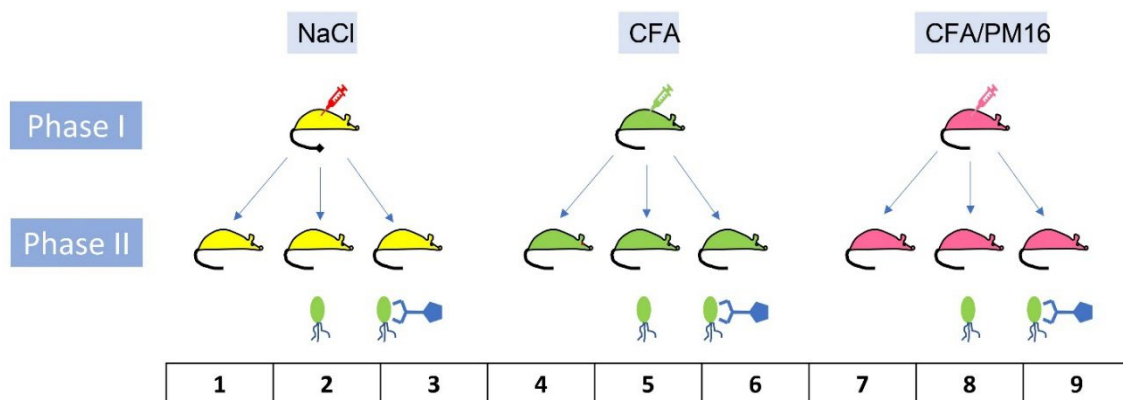


Fig. 1. Experimental design

To evaluate the serological response to *P. mirabilis*, bacteria were immobilised on ibidi μ -plate after incubation with experimental sera and imaged using confocal microscope. After injection with bacteria, all groups have developed a response against *P. mirabilis* as seen in Figure 2. Although the effect is more pronounced in groups that previously

immunized with CFA or PM16+CFA, no significant difference was noticed between the mentioned two groups; referring to the idea that PM16 encounter has no effect on the immune response against *P. mirabilis*. Using ELISA, the serological response to PM16 was investigated. An increase in IgG levels was noticed in groups 2-9, except for group 4. It is observed that after injection with bacteria, anti-PM16 response was higher in all three groups (intact, CFA or CFA/PM16). This effect is higher in mice treated with phages after infection, in the groups previously immunised with CFA or CFA/PM16, with more profound effect in CFA/PM16 groups. No such difference was noticed between 2 and 3 groups. Highest levels were noticed in the groups 8 and 9; as they were previously immunised with PM16.

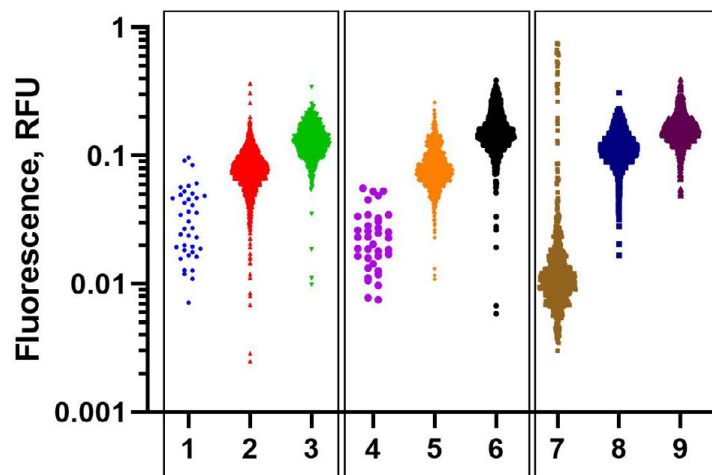


Fig. 2. *Proteus mirabilis* serum binding two weeks following bacterial injection in Phase II of the experiment

The lytic activity of PM16 was tested after incubation with experimental sera in order to investigate the neutralising activity of anti-PM16 antibodies. Groups 1-3 showed a weak neutralising activity while this effect increases in groups 5-9. We believe that the immunomodulatory effect of the CFA in groups 5 and 6 contributes to the increased neutralising ability of anti-PM16 antibodies. On the other hand, the previous encounter with the bacteriophage plays this role in groups 7-9. Interestingly, by comparing groups 7 and 8, the neutralising activity increases after the injection with *P. mirabilis*.

This work demonstrates that while phage therapy may have such an adverse effect as the formation of phage-neutralising antibodies, it does not necessarily lead to the exacerbation of bacterial infection. Despite preventing phage binding to the bacteria, bacteriophage injection boosts the humoral immune response specific to the bacterium, an effect that may outweigh the phage-neutralizing ability. Importantly, phage neutralizing antibodies maintain and even, at some level, increase bacteria-specific immune response.

References

1. Chechushkov A, Kozlova Y, Baykov I, Morozova V, Kravchuk B, Ushakova T, et al. Influence of Caudovirales Phages on Humoral Immunity in Mice. *Viruses*. 2021 Jun 26;13(7):1241.
2. Gembara K, Dąbrowska K. Phage-specific antibodies. *Curr Opin Biotechnol*. 2021 Apr 1;68:186-92.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-224

**RDH12, DELIVERED BY AAV8 AND AAV9 VECTORS,
RESTORES RETINOL DEHYDROGENASE FUNCTION *IN VITRO***

D. T. Gurtsieva, A. D. Egorov, E. S. Minskaia, A. N. Brovin, S. V. Zhuravleva, A. V. Tumaev, A. V. Karabelsky

Sirius University of Science and Technology, Sochi

✉ gurtsieva.dt@talantiuspeh.ru

Abstract

Leber congenital amaurosis (LCA), one of the main causes of blindness in children, accounts for at least 5 % of all retinal dystrophies. To date, at least 26 LCA-causing genes (mostly inherited in an autosomal recessive manner) with more than 400 mutations have been identified [1]. Defects in Retinol Dehydrogenase 12 (*RDH12*), an NADPH-dependent retinal reductase displaying high activity toward 9-*cis* and all-*trans*-retinol and participating in the metabolism of short-chain aldehydes, cause LCA type 12 and Retinitis Pigmentosa 53 [2].

In the absence of appropriate *RDH12*-disease animal models [3], development of *in vitro* test systems confirming the function and efficacy of the newly developed gene therapy vectors is essential. The basis of this functional activity test is *RDH12* enzyme's ability to reduce the cytotoxic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE) which is formed as a retinoid cycle intermediate and provokes adduct formation and proteasome protein degradation, which activate cell death of photoreceptor cells *in vivo* and model cell lines *in vitro* [4].

The restoration of *RDH12* functional activity upon AAV vector transduction was expected to increase resistance to the treatment with 4-HNE and, therefore, decrease cell death rates.

Results

AAV vectors AAV8-GFP, AAV8-*RDH12*wt, AAV8-*RDH12*opt, AAV9-GFP, AAV9-*RDH12*wt and AAV9-*RDH12*opt were produced at 4,2x10E12, 6,94x10E12, 1,37x10E12, 9,48x 10E11, 9,9x10E11, 2,82x10E12 vg/ml, respectively. The level of transduction efficiency of human embryonic kidney (HEK293) cells by AAV8-GFP (1200000 μm^2 /image of green fluorescent luminescence events) was 30 times higher than that of AAV9-GFP (39000 μm^2 /image) as demonstrated by the green fluorescent protein (GFP) fluorescence in live imaging microscopy IncuCyte S3. High expression levels of wild type (wt) or codon optimized (opt) *RDH12* genes were observed 48-72 hours after transduction with AAV8- and AAV9-based vectors at 80,000 MOI in the absence of cytopathic effect.

Expression levels of *RDH12*wt and *RDH12*opt, delivered by AAV8, were 150-fold and 12500-fold higher, respectively, while those delivered by AAV9 were 25-fold and 3500-fold higher, as compared to nontransduced control in RT-qPCR.

Interestingly, AAV9-*RDH12*opt-transduced human retinal pigmented epithelium cells (ARPE-19) demonstrated lower average numbers of late apoptotic cells after incubation with 4-HNE at concentrations of 60, 100 and 140 μM /ml (18,6 %) as compared to AAV9-GFP transduced cells (25 %) as measured by flow cytometry with propidium iodide staining (p-value <0.01, two-way ANOVA, Tukey test). The data suggests that the codon-optimized gene *RDH12*opt may delay the onset of apoptosis in ARPE-19 cells.

In HEK293 cells, transduction by either AAV8-*RDH12*wt (34,68 % dead cells) or AAV8-*RDH12*opt (39,89 % dead cells) increased cell survival by 32 % and 27 %, respectively, compared to AAV8-GFP (66,46 % dead cells) (p-value <0.001, two-way ANOVA, Tukey test). Transduction by AAV8 led to higher survival rates as compared to those by AAV9.

References

1. Daich Varela M., Michaelides M. *RDH12* retinopathy: clinical features, biology, genetics and future directions //Ophthalmic Genetics. 2022. T. 43. №. 3. C. 301-306.
2. Fahim A. T, Thompson D.A. Natural history and genotype-phenotype correlations in *RDH12*-associated retinal degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1185:209-13. Doi:10.1007/978-3-030-27378-1_34.
3. Sofia F., Cerolini S., Durham T. Report from a Workshop on Accelerating the Development of Treatments for Inherited Retinal Dystrophies Associated with Mutations in the *RDH12* Gene. *Transl Vis Sci Technol.* 2020 Jul 17;9(8):30. Doi: 10.1167/tvst.9.8.30. PMID: 32855876; PMCID: PMC7422783.
4. Marchette, L. D., et al., Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-hydroxynonenal in photoreceptor cells. *Free Radic Biol Med*, 2009.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-225

STM171, A *STENOTROPHOMONAS* BACTERIOPHAGE WITH EFFECTS ON ANTIBIOTIC ACTIVITY AGAINST BIOFILM FORMATION

G. Jdeed¹, V. Morozova², T. Ushakova², Yu. Kozlova², A. Tikunov², A. Bardasheva², N. Tikunova²¹Novosibirsk State University²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ ghadeerjdeed@outlook.com

Abstract

Stenotrophomonas maltophilia is associated with high mortality rates for immunocompromised patients. Bacteriophages appear as a promising therapeutic tool to be used as a replacement or in addition to antibiotics, currently around 63 *S. maltophilia* bacteriophages are known, and their effects when used with antibiotics and against biofilm are poorly studied.

The objective of the research was studying the effect of StM171 phage on susceptibility of different *S. maltophilia* strains toward antibiotics and on biofilm formation with or without antibiotics.

StM171 was isolated from waste water, its features were studied using different methods: host range test, step growth curve, plaquing assay, kinetics of bacteria lysis and electron microscopy. StM171 and its bacterial hosts' genomes were sequenced and analyzed using a number of tools like: Bactopia, VIPTree and VContact2. StM171 and different antibiotics ability to prevent *S. maltophilia* biofilm formation was tested in microtiter plates. StM171 hosts that gained resistance towards it were compared to the original strains in terms of susceptibility to antibiotics using disc diffusion assay.

StM171 is a *Caudovirales* temperate bacteriophage and represents a new genus with a 44kbp dsDNA that encodes 59 open reading frames (Fig. 1). StM171 has a medium host range and shows varying, strain-dependent and antibiotic dependent effects on the formation of biofilms by *S. maltophilia*, with the formation increasing in some situations. *S. maltophilia* strains that developed resistance to StM171 phage showed changed susceptibility to antibiotics compared with the original strains: most of them became susceptible to cephalosporin and penicillin-like antibiotics and became resistant to erythromycin (Fig. 2), the bacterial host strains were divided into two groups based on the similarity of antimicrobial resistance genes (Fig. 3), with *bla1* and *bla2* genes suggested as the genes responsible for changed sensitivity toward antibiotics.

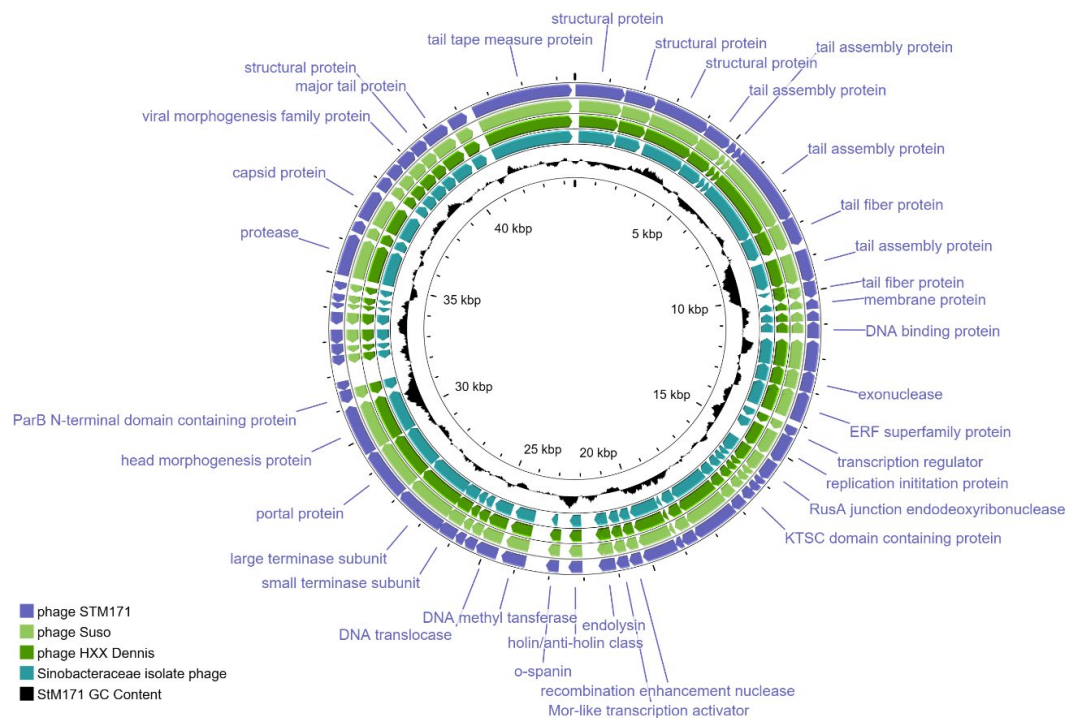


Fig. 1. StM171 phage genome features, compared with those of the phages with the highest homology (>95 %)

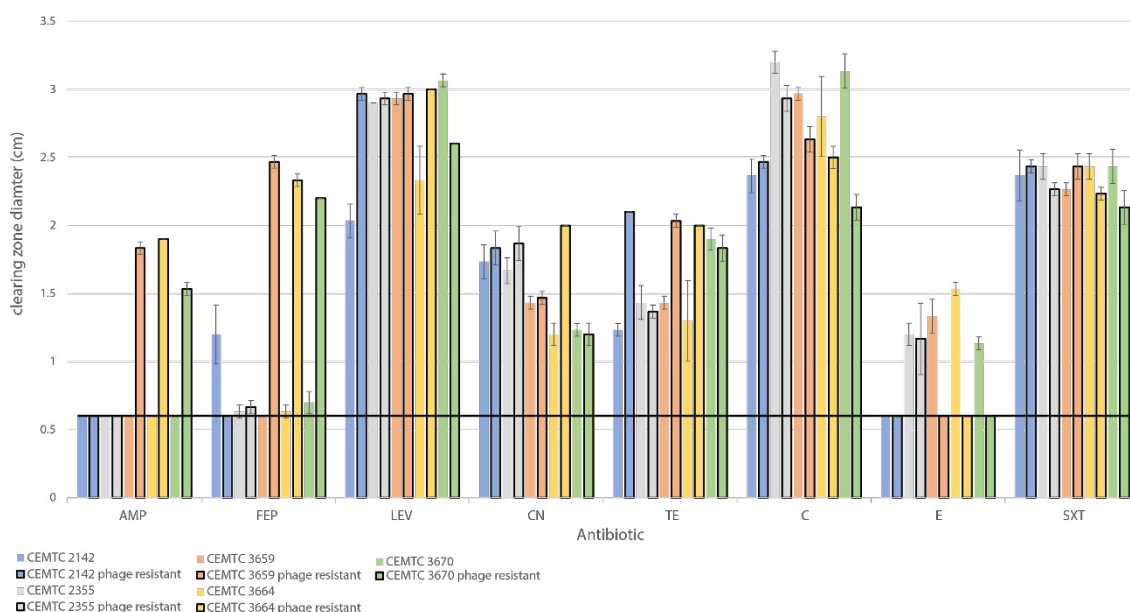


Fig. 2. Applying antibiotics in disc diffusion assay to bacterial strains before and after they developed resistance toward StM171 phage, each bolded column represents the phage-resistant bacterial strain, the black horizontal line represents the threshold diameter in disc diffusion assay above which a strain is considered susceptible toward an antibiotic. Abbreviations: AMP: ampicillin, FEP: cefepime, LEV: levofloxacin, CN: gentamicin, TE: tetracycline, C: chloramphenicol, E: erythromycin, SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole

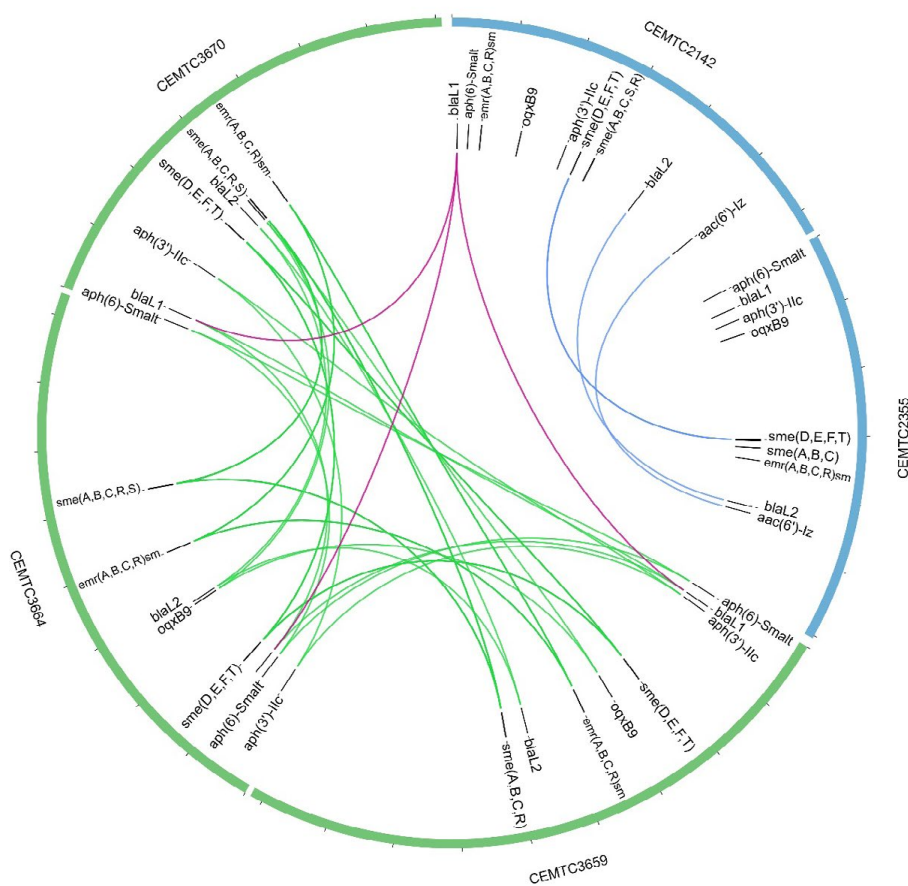


Fig. 3. A diagram showing genes of antimicrobial resistance found in StM171 bacterial hosts genomes with coverage of more than 80 % in comparison with reference genes from different databases, the links between genes represent 100 % identity

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-226

DEVELOPMENT OF A UNIVERSAL DIAGNOSTIC TEST SYSTEM FOR DETERMINING THE TITER OF ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 BY MICRONEUTRALIZATION*

A. Ya. Rak, Ya.A. Zabrodskaya, N.P. Gorbunov, D. S. Polyakov,
D.A. Mezhenkaya, L. G. Rudenko, I. N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ alexandrak.bio@gmail.com

Abstract

The study proposes a unique test system for determining the titer of neutralizing antibodies against various SARS-CoV-2 strains, including biotinylated monoclonal antibodies against the nucleocapsid protein and the recombinant streptavidin-GFP fusion protein. The key advantages of its use are high sensitivity, simplicity and low cost of analysis, the universality of detection of different coronavirus variants, and the possibility of adaptation to detect other antigens when using appropriate antibodies.

Acute respiratory infection COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 coronavirus is characterized by high contagiousness and risk of course severity, which determines its high socio-economic significance. This disease, firstly manifested in the end of 2019 and to date claimed the lives of more than 6.8 million victims, continues to be caused by new variants of SARS-CoV-2, which has high antigenic variability [1]. To control the spread of COVID-19, it is necessary to develop universal test systems for the detection of various SARS-CoV-2 strains.

One of the modern methods for COVID-19 screening is the microneutralization reaction, which allows assessing the immunity state by intensity of antiviral antibodies formation and their opsonizing activity. These features may serve as an indicator of the vaccination need and as a prognostic marker of COVID-19 outcome in individuals and experimental animals, characterizing the rate of infection spread and the degree of herd immunity formation [2].

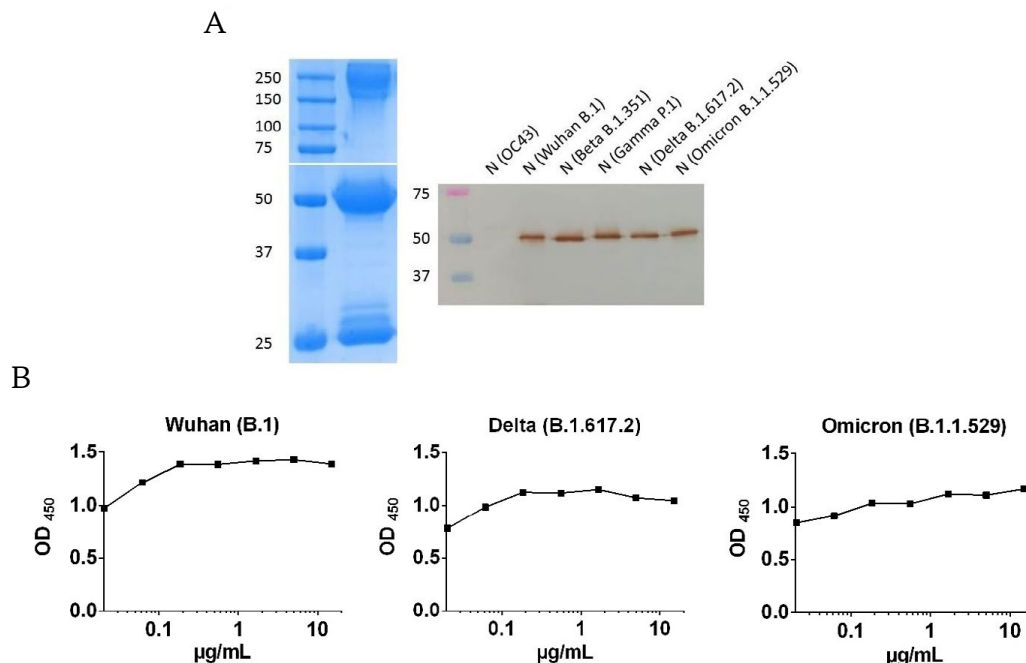


Fig. 1. Characterization of monoclonal antibodies NCL5 against the recombinant N protein of SARS-CoV-2 (B.1):

A — SDS-PAGE analysis in non-reducing (top) and reducing (bottom) conditions and immunoblotting with recombinant N proteins of various SARS-CoV-2 strains and seasonal coronavirus OC43; c B — analysis of the ability to detect various SARS-CoV-2 strains in infected cells of the Vero E6 line

*The study was supported by RSF grant № 21-75-30003.

The target antigen for most modern microneutralization-based test systems is the SARS-CoV-2 surface spike protein, which does not make it possible to determine the cause of the appearance of antiviral antibodies (vaccination or infection) and is not suitable for the detection of new variants of SARS-CoV-2, which differ mainly for this component [3]. In this regard, another highly conserved and immunogenic SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein, which is actively synthesized by infected cells [4], seems to be a much more suitable target for detection by universal analytical test systems.

In this work, previously obtained recombinant nucleocapsid (N) protein of ancestral SARS-CoV-2 strain B.1 was used as an antigen to obtain the panel of mouse monoclonal antibodies by hybridoma technology. We then selected NCL5 immunoglobulins with the IgG2a isotype and “universal” specificity, that is, the ability to most effectively recognize antigens of various SARS-CoV-2 strains from the panel of obtained anti-N(B.1) antibodies for further development of the detection system (Fig. 1). They were conjugated with biotin-X-activated ester by standard protocol and further used as a basis of a two-component immunofluorescent test system for the SARS-CoV-2 detection in infected cells of Vero E6 or CCL81 lines. The detection of coronavirus to evaluate the results of the microneutralization assay by the focus-forming unit (FFU) method was performed by the pre-incubation of virus with serum dilutions, treatment of cells with these mixes and addition of biotinylated anti-N(B.1) antibodies to formalin-fixed and permeabilized cells, followed by the addition of recombinant streptavidin-GFP fusion protein as a developing component. The assay results were assessed using the AID vSpot Spectrum (AID GmbH, Germany) in fluorescent signal detection mode.

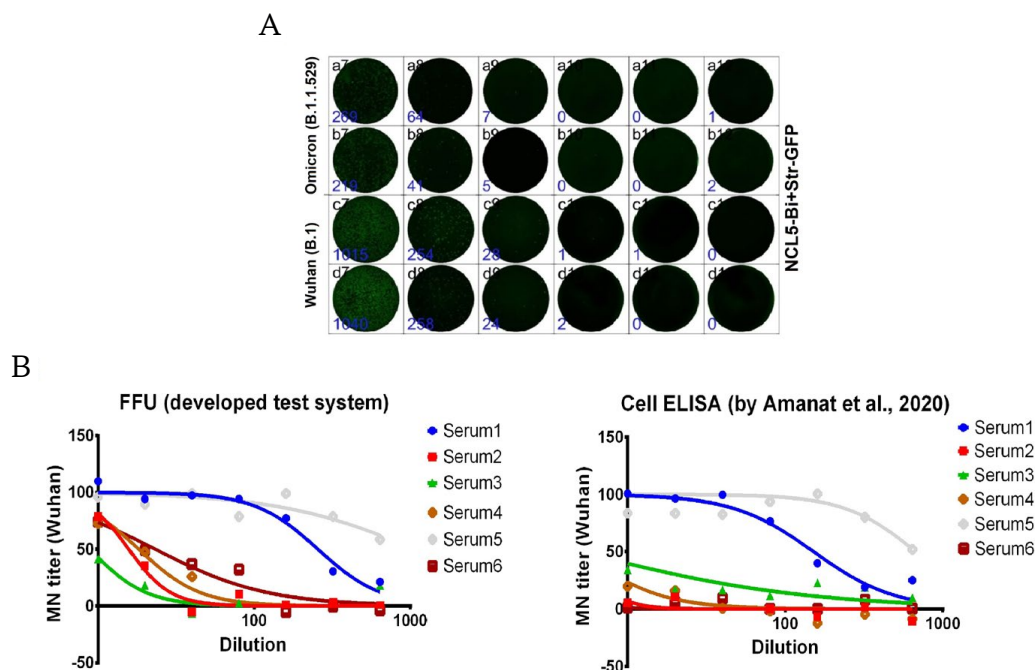


Fig. 2. Detection of SARS-CoV-2 using a test system based on biotinylated NCL5 antibodies and streptavidin-GFP in infected Vero E6 cells: A — B.1 (Wuhan) and B.1.1.529 (Omicron) strains after 12 h and 16 h after infection, respectively; B — assessment of the results of microneutralization reaction compared to the standard procedure [2]

The results of determining the infectious titer of two SARS-CoV-2 strains (lacking the microneutralization stage) and the titer of neutralizing antibodies in serums of COVID-19 convalescents using the developed two-component test system in infected cell cultures of the Vero E6 line are shown in Fig. 2. Taking into account the high sensitivity, cost-effectiveness and rapidness of analysis, the developed test system can be recommended for assessing the individual titer of neutralizing antiviral antibodies, regardless of the strain of coronavirus that caused COVID-19.

References

1. Telenti A., Hodcroft E. B., Robertson D. L. The evolution and biology of SARS-CoV-2 Variants // Cold Spring Harb Perspect Med. 2022. V. 27. No. 12(5). P. a041390.
2. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmeier S. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans // Nat. Med. 2020. V. 26. No. 7. P. 1033–1036.
3. Singh D., Yi S. V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. Exp Mol Med. 2021. Vol. 53. No. 4. P. 537–547.
4. Bessa L. M., Guseva S., Camacho-Zarco A. R. et al. The intrinsically disordered SARS-CoV-2 nucleoprotein in dynamic complex with its viral partner nsp3a // Sci. Adv. 2022. Vol. 8. No. 3. P. eabm4034.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-227

**РЕКОМБИНАЦИЯ И МОДУЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ
У РЯДА СЕМЕЙСТВ ВИРУСОВ С (+)РНК ГЕНОМОМ*****RECOMBINATION AND MODULAR EVOLUTION OF POSITIVE-STRAND RNA VIRUSES**Ю. А. Алешина¹, А. В. Орлов², А. Н. Лукашев^{1,5}¹*Институт медицинской паразитологии, тропической и трансмиссивной медицины
им. Е. И. Марциновского Сеченовского университета, Москва*²*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*³*Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Москва*Yu. A. Aleshina¹, A. V. Orlov², A. N. Lukashev^{1,5}¹*Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Disease of Sechenov University, Moscow*²*Lomonosov Moscow State University*³*Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

✉ vjulia94@gmail.com

Аннотация

Рекомбинация является одной из движущих сил эволюции (+)РНК-вирусов, обеспечивающих их генетическое разнообразие. В работе проведен систематический анализ закономерностей рекомбинации у вирусов, принадлежащих семействам *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae* и *Coronaviridae*, с помощью классических методов детекции рекомбинации и сравнения генетических дистанций в разных регионах генома.

Abstract

Recombination is one of the major forces generating genetic diversity in positive-strand RNA viruses. We systematically analyzed patterns of natural recombination in four (+)RNA virus families — *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae* and *Coronaviridae*, using both classical recombination detection methods and by comparing correspondence of genetic distances in different genome regions.

Рекомбинация широко распространена у вирусов с геномом положительной полярности относительно мРНК. Наряду с высокой скоростью накопления замен она является фактором, обеспечивающим их генетическое разнообразие [1]. В работе были проанализированы закономерности естественной рекомбинации у вирусов, принадлежащих семействам *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae* и *Coronaviridae*, с помощью общепринятых методов, реализованных в программе RDP4 [2, 3], а также с помощью матриц отклонений попарных расстояний и графиков соответствия попарных генетических расстояний в разных участках генома [4, 5].

Общим (и ранее известным) свойством эволюции рассмотренных семейств является высокая частота рекомбинации между участками, кодирующими структурные и неструктурные белки [6–9]. Причем закономерности рекомбинации внутри структурных и неструктурных областей генома различаются между изученными семействами РНК-вирусов. Для пикорнавирусов характерна частая рекомбинация в неструктурной области генома без выраженных «горячих» точек рекомбинации, при этом в структурной области рекомбинация практически отсутствует. У калицивирусов «горячая» точка рекомбинации находится на границе участков, кодирующих неструктурные и структурные белки, при этом для них характерна крайне редкая рекомбинация внутри этих участков [10]. У астровирусов умеренная рекомбинация наблюдалась и внутри структурной, и внутри неструктурной области генома. У коронавирусов в рекомбинации чаще всего участвует ген, кодирующий шиповидный белок S, но не другие гены, кодирующие структурные белки (E, M, N). Рекомбинация внутри гена белка S более выражена, чем в неструктурной области генома, причем чаще в ней участвуют целые домены белка S [4].

Таким образом, у (+)РНК-вирусов с разной организацией и реализацией генома есть сходная черта эволюции — частая рекомбинация на стыке структурных и неструктурных областей генома, что позволяет структурным и неструктурным белкам эволюционировать практически независимо. Функции белков, а не особенности организации генома, определяют относительную рекомбинационную мобильность блоков генома. С другой стороны, у вирусов близких семейств закономерности рекомбинации внутри структурного и неструктурного блоков генома различаются.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-15-00230.

© Ю. А. Алешина, А. В. Орлов, А. Н. Лукашев, 2023

Литература

1. Worobey M., Holmes E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses // *J. Gen. Virol.* 1999. V. 80. P. 2535–2543.
2. Martin D. P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // *Virus Evol.* 2015. V. 1. P. 1–5.
3. Simmonds P., Welch J. Frequency and Dynamics of Recombination within Different Species of Human Enteroviruses // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 483–493.
4. Vakulenko Y., Deviatkin A., Drexler J. F., Lukashev A. Modular Evolution of Coronavirus Genomes // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 1270.
5. Vakulenko Y. recDplot — R package for visualising recombination in viral sequences [Электронный ресурс] // *Github.com*. URL: <https://github.com/v-julia/recDplot> (дата обращения 20.07.2023).
6. Simmonds P. Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other Mammalian positive-stranded RNA viruses // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 11124–11140.
7. Lukashev A. Recombination among picornaviruses // *Rev. Med. Virol.* 2010. V. 20. P. 327–337.
8. Desselberger U. Caliciviridae Other Than Noroviruses // *Viruses.* 2019. V. 11. P. 286.
9. Bosch A., Pintó R. M., Guix S. Human astroviruses // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. V. 27. P. 1048–1074.
10. Vakulenko Y. A., Orlov A. V., Lukashev A. N. Patterns and Temporal Dynamics of Natural Recombination in Noroviruses // *Viruses.* 2023. V. 15. P. 372.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-228

НАЗАЛЬНАЯ ВАКЦИНА САЛНАВАК И СПУТНИК V ИНДУЦИРУЮТ УВЕЛИЧЕНИЕ АВИДНОСТИ СЫВОРОТОК ПРОТИВ RBD ДОМЕНА SARS-COV-2 В ТЕЧЕНИЕ ПОЛУГОДА ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ***NASAL VACCINE SALNAVAC AND SPUTNIK-V INDUCE AN INCREASE IN SERA AVIDITY AGAINST THE RBD DOMAIN OF SARS-COV-2 WITHIN SIX MONTHS AFTER REVACCINATION**Е. А. Астахова^{1,2}, К. О. Баранов³, Е. В. Зуев⁴, Д. А. Потеряев⁴, А. В. Таранин³, А. В. Филатов^{1,2}¹ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск⁴АО «Генериум», МоскваE. A. Astakhova^{1,2}, K. O. Baranov³, E. V. Zuev⁴, D. A. Poteryaev⁴, A. V. Taranin³, A. V. Filatov^{1,2}¹National Research Center Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow²Lomonosov Moscow State University³Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk⁴Generium, JSC, Moscow

✉ ast_kat@mail.ru

Аннотация

С помощью нового метода, биослойной интерферометрии (BLI), показано, что новая назальная вакцина Салнавак и Спутник V индуцируют созревание аффинности сывороточных антител доноров в течение полугода после введения вакцины.

Abstract

Using a new method, biolayer interferometry (BLI), it has been shown that the new nasal vaccine Salnavac and Sputnik-V induce the affinity maturation of donor serum antibodies within six months after the vaccination.

COVID-19 и вакцинация против SARS-CoV-2 приводят к индукции долгоживущих антител против S-белка коронавируса. Ранее мы показали, что ширина нейтрализующих антител после ревакцинации Спутником-V или BNT162b2 меняется с течением времени. Так, увеличивается нейтрализующая активность сывороток против вариантов Омикрон BA.1 и BA.4/5 [1]. Это может происходить в результате созревания аффинности сывороточных антител. Существуют данные о том, что аффинность сывороточных анти-S антител увеличивается после перенесенного COVID-19 или вакцинации BNT162b2 [2]. В отношении ревакцинации Спутником V данный вопрос изучен недостаточно.

Авидность сывороток отражает мультивалентные взаимодействия сывороточных антител с антигеном и складывается из аффинностей единичных антител, входящих в состав сыворотки. Традиционно авидность сывороток определяют с помощью ELISA в присутствии мочевины. В этих условиях низкоаффинные антитела не связываются с антигеном и не детектируются. Недостаток данного метода заключается в том, что индекс авидности зависит от концентрации мочевины и времени инкубации с сыворотками. Метод BLI позволяет определить константу диссоциации K_{dis} сыворотки, которая напрямую отражает ее авидность в отношении целевого антигена. Изначально этот метод использовали для вычисления аффинности моноклональных антител, однако в последние годы его начали применять также для определения авидности сывороток.

В настоящей работе мы исследовали авидность сывороток доноров, ревакцинированных Спутником V (14 доноров) или назальной вакциной Салнавак (11 доноров). Образцы сывороток были взяты в трех точках: до ревакцинации (точка 1), через месяц (точка 2) и через полгода (точка 3) после введения вакцины. Авидность сывороток в отношении RBD белка дикого типа определили методом BLI с использованием Ni-NTA сенсоров. K_{dis} определяли, анализируя кривые ассоциации-диссоциации с помощью бивалентной модели программного обеспечения прибора Octet Red96. Авидность IgG и IgA антител, специфичных к RBD дикого типа, определили методом ELISA в присутствии 7 М мочевины. Индекс авидности рассчитывали как отношение оптической плотности, полученной в присутствии мочевины, к оптической плотности образца без инкубации с мочевиной.

* Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00472.

© Е. А. Астахова, К. О. Баранов, Е. В. Зуев, Д. А. Потеряев, А. В. Таранин, А. В. Филатов, 2023

Вирус-нейтрализующую активность сывороток определили с помощью вирусоподобных частиц, псевдотипированных S-белком дикого типа или вариантов Delta, Омикрон BA.1 и BA.4/5 как описано ранее [1].

Медианные значения k_{dis} сывороток доноров, ревакцинированных вакциной Салнавак, составили $1,4 \cdot 10^{-2}$, $3,5 \cdot 10^{-4}$, $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ в точках 1, 2, 3 соответственно. Для доноров, ревакцинированных Спутником V значения k_{dis} равнялись $1,8 \cdot 10^{-2}$, $1,8 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ соответственно. Различий между группами доноров, получивших Салнавак или Спутник V, выявлено не было. Таким образом, обе вакцины индуцируют увеличение аффинности сывороточных антител на 2 порядка, причем это значение сохраняется в течение полугодия после введения вакцины. Индекс avidности анти-RBD антител IgG изотипа увеличился в 2,5 и 2 раза у доноров, ревакцинированных Салнаваком и Спутником V соответственно через 1 месяц после введения вакцины. Далее в течение полугодия этот показатель оставался неизменным. Индекс avidности анти-RBD антител IgA изотипа повышался в 1,5 и 1,7 раза для тех же групп доноров. Для того чтобы выяснить, влияет ли созревание аффинности антител на способность к вирус-нейтрализации, мы провели корреляционный анализ между константами диссоциации сывороток и титрами вирус-нейтрализации против WT, а также вариантов Delta, Омикрон BA.1 и BA.4/5. В обеих группах ревакцинированных доноров корреляции между K_{dis} и титрами вирус-нейтрализации во 2 и 3 точке были выше, чем в 1 точке.

Таким образом, мы показали, что обе вакцины, Салнавак и Спутник V, индуцируют созревание аффинности сывороточных антител. Увеличение корреляций между K_{dis} и титрами нейтрализующих антител свидетельствуют о том, что механизм созревания антител может лежать в основе увеличения широты нейтрализации сывороточных антител.

Литература

1. Astakhova E., et al. Antigenic Cartography Indicates That the Omicron BA.1 and BA.4/BA.5 Variants Remain Antigenically Distant to Ancestral SARS-CoV-2 after Sputnik V Vaccination Followed by Homologous (Sputnik V) or Heterologous (Comirnaty) Revaccination. *IJMS*, 2023, 24, 10493.
2. Singh G., et al. Binding and Avidity Signatures of Polyclonal Sera From Individuals With Different Exposure Histories to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection, Vaccination, and Omicron Breakthrough Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 2023, jiad116.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-229

РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СИБИРСКОГО ПОДТИПА КАК КАНДИДАТ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА В ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЕ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ ОРТОФЛАВИВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**RECOMBINANT TBEV PROTEIN E OF THE SIBERIAN SUBTYPE IS A CANDIDATE ANTIGEN IN THE ELISA TEST-SYSTEM FOR DIFFERENTIAL SERODIAGNOSTICS OF ORTHOFLAVIVIRUSES INFECTIONS**

В. Барышникова¹, Ю. Турченко¹, К. Тучинская¹, И. Белялетдинова¹, А. Бутенко², А. Деревенцова¹, Г. Игнатъев¹, В. Ларичев², Е. Ляпейкова³, А. Рогова¹, И. Холодилов¹, А. Шакарян^{1,4}, Г. Карганова¹

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

²Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

³Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

V. Baryshnikova¹, Yu. Turchenko¹, K. Tuchynskaya¹, I. Belyaletdinova¹, A. Butenko², A. Dereventsova¹, G. Ignatiev¹, V. Larichev², E. Lyapeykova³, A. Rogova¹, I. Kholodilov¹, A. Shakaryan^{1,4}, G. Karganova¹

¹Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

²D. I. Ivanovsky Institute of Virology Division,

Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

³Infectious Disease Clinical Hospital № 1 of the Moscow Healthcare Department

⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

✉ baryshnikova.vs@bk.ru

Аннотация

Использование рекомбинантных доменов (sE и dIII) белка E штамма Сухар вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в качестве антигенов в тест-системе ИФА позволило идентифицировать широкий спектр антител к различным штаммам ВКЭ. Мы протестировали 53 сыворотки пациентов с подтвержденным диагнозом КЭ, и эффективность нашей тест-системы на основе белка sE составила 98 %. Было исследовано 56 сывороток пациентов с другими ортофлавирусными инфекциями, среди которых не было выявлено ни одного положительного результата, что свидетельствует о его 100 % специфичности. Мы также протестировали сыворотки мышей и кроликов, содержащие антитела к 17 штаммам ВКЭ, принадлежащим к разным подтипам, и показали высокую эффективность и способность дифференцировать антитела к ВКЭ от антител к другим ортофлавирусам: омской геморрагической лихорадки, Повассан, желтой лихорадки, денге, Западного Нила, Зика и японского энцефалита.

Abstract

The recombinant domains (sE and dIII) of the E protein of the Suhar strain of tick-borne encephalitis virus (TBEV) were used as antigens in the ELISA test system, which allowed to identify a wide range of antibodies to various TBEV strains. We tested 53 sera from confirmed TBE patients and our sE protein-based assay was 98 % effective. 56 sera from patients with other orthoflavivirus infections were used, among which not a single positive result was detected, which indicates its 100 % specificity. We also tested mouse and rabbit sera containing antibodies to 17 TBEV strains referring to different subtypes and showed high efficiency and ability to differentiate antibodies to TBEV from antibodies to other orthoflaviviruses: Omsk hemorrhagic fever, Powassan, yellow fever, dengue, West Nile, Zika and Japanese encephalitis.

Род *Orthoflavivirus* включает 53 вида, 40 из которых патогенны для человека или позвоночных, такие как *Orthoflavivirus denguei* (вирус денге), *Orthoflavivirus flavi* (вирус желтой лихорадки — YFV), *Orthoflavivirus japonicum* (вирус японского энцефалита — JEV), *Orthoflavivirus zikaense* (вирус Зика), *Orthoflavivirus nilense* (вирус Западного Нила — WNV), *Orthoflavivirus encephalitis* (вирус клещевого энцефалита — TBEV), *Orthoflavivirus omskense* (вирус омской геморрагической лихорадки — OHFV) и *Orthoflavivirus powassanense* (вирус Powassan —

POWV) [1]. Инфекция ВКЭ может вызывать тяжелое поражение нервной системы и остается реальной угрозой для здоровья населения. Ежегодно в мире регистрируется около 10 тысяч случаев клещевого энцефалита (КЭ) [2]. В эндемичных по ВКЭ районах отмечается высокий уровень серопозитивных людей. Ортофлавирусовая инфекция в основном диагностируется с помощью серологических тестов. Особенностью рода *Orthoflavivirus* является антигенная перекрестная реактивность между представителями, что значительно затрудняет дифференциальную диагностику. В последнее время для рутинной диагностики используют только иммуноферментный анализ (ИФА). Инактивированный ВКЭ в качестве антигена для ИФА стал стандартом, и подавляющее большинство доступных коммерческих тест-систем основано на его использовании. Белок Е является основным антигеном на поверхности вирионов ВКЭ, против которого во время инфекции вырабатываются нейтрализующие антитела. Он состоит из четырех доменов: dI, dII и dIII, которые экспонированы на поверхности вируса и составляют эктодомен белка Е (sE) и ассоциированный с мембраной dIV. Домены dI и dII содержат большинство перекрестно-реактивных эпитопов, тогда как иммуноглобулиноподобный домен dIII содержит большинство вирусспецифических эпитопов. Домен dIII белка Е можно использовать в качестве антигена в дифференцирующих тест-системах. Домены dI и dII могут быть использованы в качестве антигенов в тест-системах для выявления перекрестно-реактивных антител к ортофлавирусам.

В данной работе были использованы ранее полученные антигены для ИФА-системы на основе домена dIII или белка sE штамма Сухар сибирского подтипа ВКЭ для дифференциальной идентификации антител к ВКЭ [3].

Суммарно было протестировано 109 сывороток людей, больных различными ортофлавирусовыми инфекциями. Сыворотки 53 человек были получены от людей с естественной инфекцией ВКЭ, из которых 52 дали положительный результат в нашем ИФА на основе рекомбинантного белка sE и 50 были положительны при использовании рекомбинантного белка dIII, что соответствует чувствительности 98 % для sE и 94 % для dIII. Не было положительного результата при тестировании 56 сывороток пациентов с диагнозом денге, желтая лихорадка, Зика, Западного Нила, что демонстрирует 100 % специфичность нашей системы ELISA.

При тестировании сывороток условно здоровых людей, положительных на наличие антител к вирусу клещевого энцефалита по данным ИФА с использованием коммерческой тест-системы, наблюдали совпадение результатов реакции нейтрализации, с использованием вирусов ВКЭ и ВЗН, и ИФА на основе полученных рекомбинантных белков. Это особенно важно в районах, где наблюдается коциркуляция ВКЭ и ВЗН.

Помимо специфичности, нами впервые показана высокая чувствительность предлагаемых нами рекомбинантных антигенов при выявлении антител к широкому спектру штаммов ВКЭ, принадлежащих к европейскому, сибирскому, дальневосточному и двум байкальским подтипам. Использовали охарактеризованные штаммы, выделенные в разные годы из разных источников и из разных географических регионов Европы и Азии. Антитела против ВКЭ в гипериммунных сыворотках мышей и кроликов были безошибочно идентифицированы. Причем исследованы как гипериммунные сыворотки, обладающие повышенной специфичностью, так и сыворотки мышей, взятые на 7-й день после заражения, в которых с помощью наших антигенов были выявлены антитела IgM и IgG.

Таким образом, предлагаемые нами рекомбинантные белки dIII и sE штамма Сухар ВКЭ могут стать кандидатами для создания новой специфической тест-системы ИФА.

Литература

1. Zerbini F. M.; Siddell S. G.; Lefkowitz E. J.; Mushegian A. R.; Adriaenssens E. M.; Alfenas-Zerbini, P.; Dempsey D. M.; Dutilh B. E.; García M. L.; Hendrickson R. C.; et al. Changes to Virus Taxonomy and the ICTV Statutes Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). *Arch. Virol.* 2023, 168, 175. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05797-4>.
2. Ruzek, D.; Avšič Županc, T.; Borde, J.; Chrdle, A.; Eyer, L.; Karganova, G.; Kholodilov, I.; Knap, N.; Kozlovskaya, L.; Matveev, A.; et al. Tick-Borne Encephalitis in Europe and Russia: Review of Pathogenesis, Clinical Features, Therapy, and Vaccines. *Antiviral Res.* 2019, 164, 23–51. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014>.
3. В. С. Барышникова, Ю. В. Турченко, А. А. Шишова, А. С. Климентов, К. К. Тучинская, Г. Г. Карганова. Рекомбинантный гликопротеин Е вируса клещевого энцефалита для создания дифференцирующей тест-системы. *Биотехнология.* 2022. Т. 38. № 6. С. 73–83. <https://doi.org/10.56304/s0234275822060023>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-230

**ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ НЕКАНОНИЧЕСКОГО СПЛАЙСИНГА
В НЕРЕПЛИКАТИВНОЙ РНК-РЕКОМБИНАЦИИ****POSSIBLE ROLE OF ALTERNATIVE SPLICING ENZYMES
IN NON-REPLICATIVE RNA RECOMBINATION**

А. В. Батюченко, А. А. Шишова, А. В. Деревенцова

*Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М. П. Чумакова РАН, Москва*

A. V. Batyuchenko, A. A. Shishova, A. V. Dereventsova

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*

✉ Alexey.batyuchenko@gmail.com

Аннотация

РНК-рекомбинация является важным и одним из главных механизмов эволюции РНК-вирусов. На данный момент известно два механизма этого процесса [2, 3]. Рекомбинантная молекула РНК может быть образована путем репликативного сдвига матрицы [1, 2]. Также появляется все больше информации о другом, нерепликативном механизме рекомбинации вирусной РНК [4]. Тем не менее роль клеточных факторов в этом процессе пока не изучена [2].

Abstract

RNA recombination is an important and one of the main mechanisms of RNA virus evolution. Two mechanisms of this process are currently known [2, 3]. A recombinant RNA molecule can be formed by replicative matrix switching [1, 2]. There is also increasing information about another non-replicative mechanism of viral RNA recombination [4]. However, the role of cellular factors in this process is still under investigation [2].

В данной работе изучалась роль ферментов неканонического сплайсинга в процессе рекомбинации вирусной РНК, в частности эндонуклеазы Ire1 и клеточной РНК лигазы HSPC117(RTCB). Ire1 участвует в неканоническом сплайсинге мРНК Xbp1 в цитоплазме. Была сконструирована химерная РНК вируса полиомиелита со структурой, имитирующей интрон Xbp1 в кодирующей последовательности 3D-полимеразы. Эти мутации приводят к неудачной репродукции вируса за счет сдвига открытой рамки считывания. Но реактивация активности эндонуклеазы Ire1 с помощью химических индукторов UPR приводила к удалению интрона и восстановлению вирусной репродукции. Такая же последовательность с точечными мутациями, нарушающими сайт разрушения Ire1 в структуре интро- на Xbp1 была вставлена в кодирующую последовательность 2A-протеазы полиовируса. Сконструированный вирус также показал повышенную жизнеспособность при активации Ire1. Также были получены клеточные линии Vero со сниженной экспрессией генов Ire1 и HSPC117(RTCB) для изучения влияния этих ферментов на процесс нерепликативной рекомбинации энтеровирусов. Таким образом, наше исследование показывает колокализацию РНК полиовируса и Ire1, а также возможную роль ферментов неканонического сплайсинга в вирусной РНК-рекомбинации.

Литература

1. Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses / G. Oprisan, M. Combiescu, S. Guillot [et al.] // Journal of General Virology. — 2002. Vol. 83. № 9. P. 2193-2200.
2. Nonreplicative homologous RNA recombination: Promiscuous joining of RNA pieces? / A. P. Gmyl, S. A. Korshenko, E. V. Belousov [et al.] // RNA. 2003. Vol. 9. Nonreplicative homologous RNA recombination. № 10. P. 1221-1231.
3. Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus / A. P. Gmyl, E. V. Belousov, S. V. Maslova [et al.] // Journal of Virology. 1999. Vol. 73. № 11. P. 8958-8965.
4. Recombination in Enteroviruses Is a Biphasic Replicative Process Involving the Generation of Greater-than Genome Length "Imprecise" Intermediates / K. Lowry, A. Woodman, J. Cook, D. J. Evans // PLoS Pathogens. 2014. Vol. 10. № 6. P. e1004191.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-231

МИКРОРНК ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ИНГИБИРУЮТ АУТОФАГИЮ**CYTOMEGALOVIRUS MICRORNAS INHIBIT AUTOPHAGY**

Е. Д. Беляева, Д. Р. Файзуллина

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

E. D. Belyaeva, D. R. Fayzullina

Sechenov First Moscow State Medical University

✉ DFayzullina@yandex.ru

Аннотация

Персистенция цитомегаловируса коррелирует с агрессивностью некоторых онкологий человека. Мы показали, что вирусная микроРНК UL70-3P подавляет аутофагию в клетках глиобластомы. Регуляторные молекулы как действуют конститутивно, так и секретируются в составе экзосом для воздействия на микроокружение клетки.

Abstract

Cytomegalovirus persistence correlates with the aggressiveness of some human cancers. We have shown that the viral microRNA UL70-3P suppresses autophagy in glioblastoma cells. Regulatory molecules both act constitutively and are secreted as part of exosomes to influence the cell microenvironment.

Цитомегаловирус человека — ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству герпесвирусов, подсемейству β -герпесвирусов. Он широко распространен в человеческой популяции, разные оценки приводят цифры от 45 % до 100 % сероположительных женщин репродуктивного возраста в популяции для разных регионов, показатели серораспространенности для мужчин немногим ниже [1]. Инфекция часто переходит в латентную форму, которая плохо поддается терапии. Повторная активация вируса может представлять большую опасность для людей с пониженным иммунитетом, в том числе при трансплантации органов и тканей и для ВИЧ-инфицированных. Кроме того, персистенция цитомегаловируса является дополнительным фактором риска при развитии многих типов рака. Специфическая роль белков цитомегаловируса была показана, например, в прогрессии глиобластомы.

Глиобластома составляет почти 50 % всех новообразований головного мозга со средней выживаемостью около 15 месяцев [2]. Она обычно характеризуется высокой митотической активностью, ядерной атипией, клеточным полиморфизмом и клеточной инвазивностью, что способствует распространению опухоли в близлежащие ткани головного мозга. При этом глиобластома демонстрирует высокую толерантность к существующим методам химиотерапии, поэтому необходимо достичь более глубокого понимания ее биологии и разработать новые способы терапии.

Представленная работа демонстрирует связь между регуляторной микроРНК цитомегаловируса и процессом аутофагии в клетках глиобластомы. Аутофагия является одним из базовых защитных механизмов организма, использующихся при противовирусном ответе. Кроме того, ее активация улучшает прогнозы выживаемости онкологических больных. Вирусные регуляторные РНК подавляют аутофагию в инфицированных клетках и способны продуцировать экзосомы с микроРНК, также имеющими ингибирующий эффект.

Подобная связь была изучена для микроРНК цитомегаловируса UL70-3P на модели перевиваемых клеточных линий глиобластомы U87. Для получения экзосом с микроРНК использовались первичные короткоживущие клеточные культуры T31 и T89. Наличие и количество UL70-3P miRNA в экзосомах было продемонстрировано при помощи ПЦР (контроль — RNAU6-1). Для изучения эффекта экзосом на аутофагию на модели перевиваемой линии U87 незараженные вирусом клетки инкубировались с содержащими регуляторные микроРНК экзосомами, далее эти клетки были окрашены на белки LC3A/B, которые являются стандартными маркерами уровня аутофагии. Для иммуноцитохимии использовались первичные антитела против LC3A/B (GB11124) и вторичные козы антитела против кролика (A27034), свечение было зафиксировано при помощи флуоресцентного микроскопа EVOS M5000. Мы обнаружили, что в контрольных клетках (инкубированных со средой без экзосом) наблюдался гораздо более высокий уровень флуоресценции, чем в клетках, проинкубированных с вирусными экзосомами, а следовательно, уровень аутофагии в них был выше. Это подтверждает нашу гипотезу о регуляции аутофагии вирусной UL70-3P miRNA.

Мы также получили другие, косвенные свидетельства, демонстрирующие роль изучаемой микроРНК в регуляции аутофагии клеток глиобластомы. Предварительно инфицированные цитомегаловирусом клетки переносимой линии U87 были трансфицированы ингибитором UL70-3P (RNAi, Abi USA). Для клеточного лизата, полученного из данной культуры, был проведен вестерн-блот анализ. По результатам этого эксперимента нами показано, что ингибитор miR-UL70-3p снижает уровень фосфорилирования p70 S6 киназы, индуктора аутофагии, в клетках U87 (инфицированных цитомегаловирусом), что указывает на изменение уровня аутофагии.

Таким образом, цитомегаловирус может играть роль в развитии глиобластомы и влиять на уровень аутофагии в клетках. Это взаимодействие обусловливается регуляторными молекулами, в том числе микроРНК UL70-3P, которые не только взаимодействуют с мишенями внутри инфицированных клеток, но и секретируются в составе экзосом. В целом эти результаты могут иметь важное значение для понимания механизмов развития глиобластомы и для поиска новых подходов к лечению этой опухоли.

Литература

1. Cannon M. J. et al. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection / M. J. Cannon D. S. Schmid T. B. Hyde // Rev. Med. Virol. 2010. Vol. 20. № 4. P. 202–213.
2. Thakkar J.P., Dolecek T.A., Horbinski C., Ostrom Q.T., Lightner D.D., Barnholtz-Sloan J.S., Villano J.L. (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 23:1985–1996.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-232

**ШТАММЫ ВИРУСА ПУУМАЛА, ВЫЗВАВШИЕ ВСПЫШКУ ГЛПС
В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2019 Г., БЫЛИ ЗАНЕСЕНЫ ИЗ УДМУРТИИ**

**AN OUTBREAK OF HFRS IN THE SARATOV REGION IN 2019 WERE CAUSED BY PUUMALA VIRUS
STRAINS IMPORTED FROM UDMURTIA**

Е. А. Блинова^{1,3}, У. А. Кресова², Т. К. Дзагурова³

¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

²Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области

³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М. П. Чумакова РАН, Москва

E. A. Blinova^{1,3}, U. A. Kresova², T. K. Dzagurova³

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

²Center for Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region

³Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

✉ blinova.e@cmd.su

Аннотация

На территории России вирус Пуумала является наиболее важным патогеном, вызывающим геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС). В данном исследовании было показано, что генетические варианты вируса Пуумала, породившие вспышку ГЛПС в Саратовской области в 2019 году, являются потомками штаммов из Удмуртии, которые были предположительно занесены на территорию Саратовской области путем антропогенного переноса вниз по течению рек Кама и Волга.

Abstract

In Russia, the Puumala virus is the most important pathogen causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). This study demonstrated, that the genome variants of the Puumala virus that caused the outbreak of HFRS in the Saratov region in 2019 are descendants of strains circulating in Udmurtia, which were presumably introduced into the territory of the Saratov region by anthropogenic transfer downstream of the Kama and Volga rivers.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является наиболее распространенным зоонозным заболеванием на территории России. Ее возбудителями являются патогенные вирусы из рода *Orthohantavirus*, персистирующие в популяциях грызунов. Заражение человека происходит путем вдыхания пылевых аэрозолей, контаминированных экскрементами инфицированных животных. На территории России распространены шесть патогенных хантавирусов: Пуумала, Куркино, Сочи на Европейской территории, а также Хантаан, Амур и Сеул на Дальнем Востоке. Основной вклад в заболеваемость ГЛПС на территории России вносит вирус Пуумала, его доля составляет более 97 % от общего числа случаев заболевания [1]. Природным резервуаром вируса Пуумала является рыжая полевка (*Myodes glareolus*).

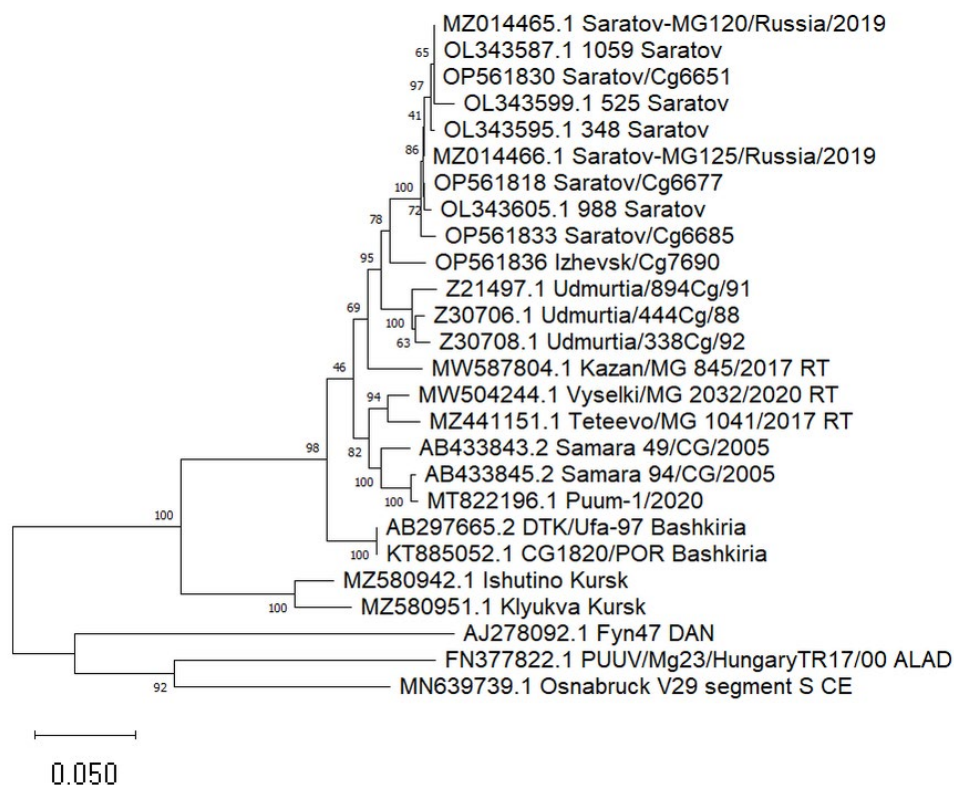
Заболеваемость ГЛПС варьирует год от года в зависимости от климатических условий, влияющих на популяции грызунов-носителей вирусных возбудителей. В 2019 году среди жителей города Саратова и Саратовского района была зарегистрирована вспышка ГЛПС с общим числом заболевших более 2700 человек [2]. Ранняя весна, а также активное подснежное размножение рыжих полевок предположительно являлись факторами, повлекшими данную вспышку.

На территории Саратовской области и Удмуртии (окрестности города Ижевск) был собран материал от рыжих полевок. Вирусная РНК была выделена из образцов тканей легких, материал был амплифицирован и секвенирован методом Сэнгера. В результате были получены три последовательности из Саратовской области (OR561830, OR561818, OR561833) и одна из Удмуртии (OR561836). Филогенетический анализ был проведен методом Maximum Likelihood в программе MEGA X [3].

Филогенетический анализ (см. рисунок) показал, что все последовательности из Саратова группируются вместе и располагаются на одной из ветвей клады, относящейся к Удмуртии, чье генетическое разнообразие более обширно. Такое расположение свидетельствует о том, что все анализируемые последовательности

из Саратовской области являются потомками штамма из Удмуртии, наиболее родственного геномному варианту из Ижевска.

Саратов и Ижевск географически удалены друг от друга, расстояние между ними составляет приблизительно 750 км. Генетические варианты вирусов из регионов, расположенных между ними (Самарская область и Республика Татарстан) филогенетически более далеки и расположены на других ветвях дерева (см. рисунок).



Филогенетическое дерево на основании полной рамки считывания (1302 нуклеотидов) S сегмента вируса Пуумала

Тот факт, что все последовательности из Саратова группируются на одной из нескольких ветвей, относящихся к Удмуртии, свидетельствует о том, что некоторые штаммы, циркулировавшие в Удмуртии (скорее всего поблизости от Ижевска), были случайным образом занесены в Саратов и дали начало всему местному разнообразию. При этом они миновали территории, расположенные между ними. В этой ситуации маловероятным представляется такое переселение полевых естественным путем. Предположительно, это могло произойти вследствие перевоза (вероятно, на корабле или барже с зерном) одной или нескольких зараженных полевых вниз по рекам Каме и Волге в обход Самары.

Примеры таких миграций могут послужить иллюстрацией того, как деятельность человека может стать причиной распространения патогенных вирусов на дальние расстояния.

Литература

1. Tkachenko E., Kurashova S., Balkina A., Ivanov A., Egorova M., Leonovich O., et al. Cases of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Russia during 2000–2022 // *Viruses* 2023. V. 12;15(7). P. 1537. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/7/1537>
2. Яшина Л.Н., Трегубчик Т.В., Малышев Б.С., Сметанникова Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А., Швалов А.Н., Зайковская А.В., Казанцев А.В., Чекашов В.Н., Красовская Т.Ю. Возбудитель вспышки ГЛПС в Саратовской области, 2019 // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021. Т. 4 С. 150–156.
3. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, editor // *Mol Biol Evol*. 2018. V.1;35(6). P. 1547–9.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-233

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА И SARS-COV-2 ОТ СЛУЧАЕВ СОВМЕСТНОГО ЗАРАЖЕНИЯ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2022–2023 гг.

GENETICAL ANALYSIS OF INFLUENZA VIRUS AND SARS-COV-2 FROM COINFECTION CASES IN RUSSIAN FEDERATION IN EPIDEMIOLOGICAL SEASON 2022–2023

Н. Д. Болдырев, Н. П. Колосова, А. В. Даниленко, С. В. Святченко,
Г. С. Онхонова, М. Е. Старчевская, В. Ю. Марченко, А. Б. Рыжиков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

N. D. Boldyrev, N. P. Kolosova, A. V. Danilenko, S. V. Svyatchenko,
G. S. Onkhonova, M. E. Starchevskaya, V. Yu. Marchenko, A. B. Ryzhikov

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ Boldyrev_nd@vector.nsc.ru

Аннотация

В условиях пандемии новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, после годового перерыва, продолжается сезонная циркуляция гриппа. При такой совместной циркуляции возникает опасность заражения смешанной инфекцией, что может привести к более тяжелому течению заболевания. Мониторинг респираторных инфекций в эпидемическом сезоне 2022–2023 гг. показал наличие случаев смешанного заражения вирусами гриппа и SARS-CoV-2. Большинство образцов получено от людей, находящихся в группе риска. Среди выявленных случаев коинфекции была отмечена более высокая встречаемость случаев с летальным исходом, чем среди случаев заболеваний гриппом и COVID-19 по отдельности. Случаи коинфекции требуют особого внимания при эпидемиологическом мониторинге, диагностике и лечении.

Abstract

In the pandemic context of a novel coronavirus infection SARS-CoV-2, after a year break, the seasonal circulation of influenza continues. With such cocirculation, there is a risk of a mixed infection, which can lead to a more severe course of the disease. Monitoring of respiratory infections in the epidemic season 2022–2023 showed the presence of mixed influenza viruses and SARS-CoV-2 infection cases. Most specimens were received from people at risk group. Among detected cases of coinfection, a higher incidence of cases with a fatal outcome was detected than among detected cases of influenza and COVID-19 separately. Cases of coinfection require special attention in epidemiological monitoring, diagnosis and treatment. Identified cases of coinfection are associated with higher severity and mortality than cases of influenza and COVID19 separately. Such cases require special attention in epidemiological monitoring, diagnosis and treatment.

Цель работы — оценить распространенность случаев смешанного заражения вирусами гриппа и SARS-CoV-2 и выявить закономерности их возникновения и течения.

Результаты

В эпидемическом сезоне 2022–2023 гг. среди проб, поступивших в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора из различных регионов Российской Федерации, было выявлено 25 образцов, содержащих одновременно вирусы гриппа и SARS-CoV-2. Из них 5 образцов — от летальных случаев заболевания (20 %).

От общего количества образцов гриппа (25015) в России в данном эпидемическом сезоне (FluNet, WHO) число смешанных образцов составляет 0,1 %. Спорадические случаи совместного заражения выявлялись в различных регионах страны.

К группам риска по возрасту (младше 5 лет и старше 60 лет) и сопутствующим заболеваниям относятся 16 случаев (64 %) из 25 подтвержденных.

Все выявленные в смешанных образцах изоляты SARS-CoV-2 относятся к варианту Омикрон, к различным кладам, характерным для сезона.

Из выявленных изолятов гриппа 22 образца относились к генотипу H1N1pdm09 клады 6B.1A.5a.2a, доминировавшей в России в данном эпидемическом сезоне, 3 образца — к вирусу гриппа В клады V1A.3a.2, доминировавшей в России в конце сезона.

Таким образом, коинфицирование происходит за счет преобладающих в циркуляции вариантов обоих вирусов и преимущественно затрагивает группы риска — людей с ослабленной по разным причинам иммунной системой, или другими факторами, ассоциированными с пониженной сопротивляемостью. Изучение случаев коинфекции важно для эпидемиологического анализа и прогноза, а также для оптимизации рекомендаций по профилактике и лечению респираторных заболеваний, особенно для групп риска.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-234

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АНТИТЕЛ
К ВИРУСУ ALONGSHAN ГРУППЫ JINGMENVIRUS*****DEVELOPMENT OF TEST SYSTEMS FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES
TO THE ALONGSHAN VIRUS OF THE JINGMENVIRUS GROUP**

Е. В. Бондаренко, И. С. Холодилов, Е. А. Ермолаева, А. Г. Литов, Г. Г. Карганова

*Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М. П. Чумакова РАН, Москва*

E. V. Bondarenko, I. S. Kholodilov, E. A. Ermolaeva, A. G. Litov, G. G. Karganova

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*

✉ katebondlie@gmail.com

Аннотация

Разработанная нами тест-система ИФА на основе рекомбинантного участка белка VP3 и белка VP2 позволяет детектировать антитела к вирусу Alongshan группы Jingmenvirus. Мы протестировали гипериммунные мышиные сыворотки к вирусу Alongshan, в иммуноблоте и иммуноферментном анализе эти сыворотки специфично связывались с белком VP2. Также мы исследовали сыворотки 115 пациентов с антителами к вирусу клещевого энцефалита, 16 из них имели антитела к белку VP2 и 3 к белку VP3. Результаты ИФА были подтверждены иммуноблотом.

Abstract

The ELISA test system developed by us based on the recombinant region of the VP3 protein and the VP2 protein makes it possible to detect antibodies to the Alongshan virus of the Jingmenvirus group. We tested hyperimmune mouse sera to the Alongshan virus; in immunoblot and enzyme immunoassay, these sera specifically bound to the VP2 protein. We also examined the sera of 115 patients with antibodies to the tick-borne encephalitis virus, 16 of them had antibodies to the VP2 protein and three to the VP3 protein. The ELISA results were confirmed by immunoblot.

Сравнительно недавно была охарактеризована группа вирусов Jingmenvirus. Данная группа имеет родство к семейству *Flaviviridae*, но в отличие от представителей этого семейства имеет сегментированный РНК-геном положительной полярности. Он представлен четырьмя сегментами, два из которых кодируют белки подобные NS2b-NS3 и NS5 белкам ортофлавивирусов. Остальные же сегменты генома кодируют белки, которые не имеют известных гомологов.

Представители группы Jingmenvirus, такие как вирус Alongshan и вирус Jingmen tick распространены по всему миру, том числе и в России. Они детектированы в клещах разных видов в Республике Карелия, Челябинской и Калининградской областях, республиках Татарстан и Тыва [2]. Описаны случаи детектирования Jingmen tick virus в крови пациентов с диагнозом Конго-крымская геморрагическая лихорадка методом ПЦР в Ростове-на-Дону в 2020 г. [1].

На данный момент отсутствуют эффективные системы для детекции антител к вирусу Alongshan. В связи с этим в данной работе была поставлена цель разработки тест-системы, способной детектировать антитела к вирусу Alongshan.

В работе был использован штамм Миасс 527 вируса Alongshan. Для получения рекомбинантных белков была выбрана бактериальная система экспрессии.

В качестве вектора использовались плазмиды рЕТ28a+ (для получения рекомбинантного белка VP2) и рQE32 (для получения рекомбинантного участка белка VP3).

После получения генно-инженерных конструкций были подобраны условия экспрессии, такие как температура, время индукции и концентрация индуктора lac-оператора (IPTG). Целевые белки были выделены методом аффинной хроматографии на гравитационных колонках с использованием набора QIAGEN Ni-NTA Fast Start. Наличие белка в элюате было подтверждено методами электрофореза в ПААГ и Western blot с использованием антител к 6xHis.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 21-14-00245.

© Е. В. Бондаренко, И. С. Холодилов, Е. А. Ермолаева, А. Г. Литов, Г. Г. Карганова, 2023

Концентрацию выделенного белка измеряли по методу Брэдфорда: для рекомбинантного участка белка VP3 она составила 70 мкг/мл, для VP2 — 120 мкг/мл с 250 мл культуры клеток.

С помощью Western blot и использования гипериммунных мышинных сывороток к вирусу Alongshan была подтверждена экспрессия и показана способность взаимодействовать с противовирусными антителами рекомбинантного белка VP2, в то время как рекомбинантный участок белка VP3 не взаимодействовал с антителами в Western blot. Результаты были подтверждены в иммуноферментном анализе. Это позволяет нам использовать белок VP2 для детекции антител против вируса Alongshan в сыворотках.

Были использованы 106 сывороток условно здоровых людей из Москвы и Московской области (любезно предоставленные ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области»), имеющих антитела к вирусу клещевого энцефалита. Было выявлено 14 сывороток (13,2 %), содержащих антитела к белку VP2 вируса Alongshan, 3 сыворотки из них содержали антитела к белку VP3.

Также были исследованы сыворотки 9 пациентов с диагнозом клещевой энцефалит (материалы любезно предоставлены ИКБ №1 г. Москвы) — в двух сыворотках пациентов были обнаружены антитела IgG к белкам VP2 и VP3.

Литература

1. Терновой В. А., Гладышева А. В., Семенцева А. О. и др. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России // Вестник РАМН. 2020. Т. 75(2). С. 129–134.
2. Kholodilov I. S., Belova O. A., Morozkin E. S., Litov A. G., et al. Geographical and Tick-Dependent Distribution of Flavi-Like Alongshan and Yanggou Tick Viruses in Russia // Viruses. 2021. V. 13(3). P. 458.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-235

**СОЗДАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ НОВЫХ ВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИЙ NGS*****DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL AND ANALYTICAL METHODOLOGY FOR DETECTION
OF NEW VIRUSES BASED ON NGS TECHNOLOGIES**Н. И. Борисова^{1**}, Г. В. Роев^{1,2**}, М. Р. Аглетдинов^{1,2}, Н. В. Чистякова³, К. Ф. Хафизов¹¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва²Московский физико-технический институт, Долгопрудный³Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, МоскваN. I. Borisova^{1**}, G. V. Roev^{1,2**}, M. R. Agletdinov^{1,2}, N. V. Chistyakova³, K. F. Khafizov¹¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny³Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow

✉ niborisova@list.ru, roevherman@gmail.com

Аннотация

Согласно различным оценкам, мы знаем лишь малую долю существующих вирусов — менее 1 % их геномов находятся в базах данных. Использование NGS-технологий в сочетании с методами амплификации, основанными на единичных праймерах, дает возможность не просто обнаружить последовательности до сих пор неизвестные вирусы, но и получать более детальную информацию об их нуклеотидной структуре.

Abstract

Different estimates suggest that we only know a small fraction of existing viruses, with less than 1 % of their genomes represented in databases. The combination of NGS and single-primer amplification techniques allows us to not only identify sequences that may pertain to unknown viruses, but also to gather a more comprehensive understanding of their nucleotide composition.

Введение

Нами было предложено использовать систему на основе подхода SMART (switching mechanism at the 5' end of the RNA transcript) для идентификации не изученных на сегодняшний день вирусов. Ревертаза MMLV обладает способностью безматрично присоединять несколько dC к растущей цепи кДНК при достижении 5'-конца РНК, что делает возможным отжиг адаптера, смену матрицы и синтез 3'-конца кДНК по адаптеру. При помощи биоинформатического анализа сначала потенциально возможно определить последовательности в данных NGS комплексных образцов, с высокой долей вероятности относящиеся к неизученным на сегодняшний день вирусам. Далее, с использованием единичных праймеров, специфичных к данным последовательностям, и подхода SMART, возможно секвенировать уже более протяженные фрагменты геномов таких вирусов.

Методы

В данной работе был исследован образец фекалий *Nyctalus noctula*, собранный зимой 2023 г. Выделение РНК из образцов производилось с использованием набора QIAamp Viral RNA (Qiagen, Германия).

Первоначально было проведено метагеномное секвенирование, и библиотеки были подготовлены следующим образом. Обратная транскрипция и синтез второй цепи ДНК проводились с использованием наборов Reverta-L kit (AmpliSens, Россия) и Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module (все — NEB, США). Очищенная двуцепочечная ДНК была фрагментирована на приборе Covaris M220 (Covaris, США) до ~550 bp. Библиотеки были сконструированы с помощью наборов End Repair/dA-Tailing Module, Ligation Module и Q5 Master Mix (NEB, США). Секвенирование проводили на приборе NextSeq 2000 (Illumina, США).

Данные метагеномного секвенирования были проанализированы с помощью Kraken2 с использованием базы данных NCBI nt (от 02.03.2023). Было обнаружено большое разнообразие прочтений, относящихся к множеству вирусных таксонов. Однако в данной работе нас интересовали прочтения, слабо похожие на известные вирусы, с целью последующего применения для них методики SMART.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-24-00078.

** Равный вклад / Equal contribution.

© Н. И. Борисова, Г. В. Роев, М. Р. Аглетдинов, Н. В. Чистякова, К. Ф. Хафизов, 2023

Для подбора праймера для применения методики SMART из полученных данных метагеномного секвенирования с помощью инструмента BLASTX был выделен контиг с низкой степенью гомологии с уже известными вирусами. Этот контиг был классифицирован как Picornaviridae sp. с E-value = 0.0001 и идентичностью по аминокислотам 29,4 %. На данный контиг картировалось 4 прочтения. Одно из этих прочтений было выбрано для создания праймера, совмещенного с 3'-адаптером Mint. Для пробоподготовки с помощью методики SMART использовался набор Mint cDNA synthesis kit (Евроген, Россия) с заменой 3'-праймера из набора полученным специфичным праймером. Библиотека для продукта SMART была подготовлена с помощью Nextera XT DNA Library Prep kit и секвенирование проводилось на приборе Miseq (все — Illumina, США).

Полученные прочтения были обработаны Trimmomatic. Cutadapt использовался для отрезания 3'-адаптера MINT с краев. Далее следовала сборка *de novo* с Megahit и затем в собравшихся контигах необходимо было найти тот, который содержал исходное прочтение, использованное для изготовления праймера. Для этого получившиеся контиги выравнивались на прочтение с помощью minimap2.

Результаты

В данных метагеномного секвенирования были обнаружены прочтения, относящиеся к таксонам: *Algavirales*, *Articulavirales*, *Asfuvirales*, *Bunyavirales*, *Chitovirales*, *Cirivirales*, *Cryppavirales*, *Durnavirales*, *Geplafuvirales*, *Ghabrivirales*, *Hepelivirales*, *Herpesvirales*, *Imitervirales*, *Lefavirales*, *Martellivirales*, *Mononegavirales*, *Norzivirales*, *Ourlivirales*, *Pataavirales*, *Piccovirales*, *Picornavirales*, *Reovirales*, *Rowavirales*, *Sepolyvirales*, *Tymovirales*, *Zurhausevirales*. Как видно, вирусный метатранскриптом обладает большим разнообразием.

Интересно отметить, что многие из полученных прочтений продемонстрировали небольшую гомологию с уже изученными вирусами. В качестве конкретного примера, для одного из таких прочтений был создан специализированный праймер и использован метод SMART.



На рисунке изображено картирование прочтений на полученный контиг SMART (длина 4,509 bp). Слева от места отжига праймера, которое начинается с 3,080 bp, также можно видеть некоторое количество прочтений, картировавшихся на контиг, что, вероятно, вызвано неспецифичным отжигом праймера, но тем не менее покрытие в десятки раз ниже, чем в целевой области.

Таким образом, мы продемонстрировали потенциал использования метода SMART для амплификации и последующего секвенирования протяженных участков геномов (новых) РНК-вирусов. Это может быть использовано для получения протяженных фрагментов, которые обладают потенциально более высокой разрешающей способностью.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-236

ИЗУЧЕНИЕ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ НЕЙРАМИНИДАЗЫ У СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2)

STUDY OF FALSE POSITIVE AGGLUTINATION DUE TO NEURAMINIDASE ACTIVITY IN MODERN INFLUENZA A (H3N2) VIRUSES

А. Ю. Бояринцева, П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко, М. Ю. Еропкин

НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

A. Yu. Boyarintseva, P. A. Petrova, N. I. Konovalova, D. M. Danilenko, M. Yu. Erokin

Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

✉ nastb08@gmail.com

Аннотация

В ходе эволюции нейраминидаза (NA) приобрела способность связываться с эритроцитами морской свинки и давать ложную агглютинацию, что затрудняет интерпретацию результатов РГА и РТГА. С 2013 по 2023 г. было изучено более 700 штаммов А(Н3N2). Вирусы с 2013 по 2017 г. показывали тенденцию к снижению ГА-титров при добавлении ингибитора NA в 2, 8 и 16 раз. У изолятов 2018–2023 гг. ложной агглютинации не наблюдается и ГА-титр остается без изменений.

Abstract

In the result of evolution, neuraminidase (NA) has acquired the ability to bind to guinea pig erythrocytes and give false agglutination, which makes it difficult to interpret the results of hemagglutination test and HI-test. From 2013 to 2023 more than 700 A(H3N2) strains have been studied. Viruses from 2013 to 2017 showed a trend towards a decrease in hemagglutination titers with the addition of an inhibitor NA by 2, 8 and 16 times. False agglutination is not observed in isolates 2018–2023 and the HA titer stays the same.

Характерной особенностью современных вирусов гриппа А(Н3N2) является значительная антигенная гетерогенность, изменение рецепторной специфичности и ряда биологических свойств, что дает им большие селективные преимущества. При выделении и пассировании вирусов гриппа А(Н3N2) в клеточной культуре MDCK наблюдается появление и накопление адаптационных мутаций в поверхностных белках вирусов гриппа — HA и NA. Отмечается, что NA вирусов, содержащая замены T148I и D151G/N, проявляет афинность к α 2,3-клеточным рецепторам. Способность нейраминидазы взаимодействовать с сиаловыми кислотами на поверхности эритроцитов искажает результаты реакций гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА). При добавлении 20 нМ раствора озельтамивира карбоксилата блокируется активный сайт NA, и, как следствие, исчезает NA-индуцированная агглютинация эритроцитов. Для изучения свойств циркулирующих изолятов одним из этапов является тестирование штаммов в РГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата и без него.

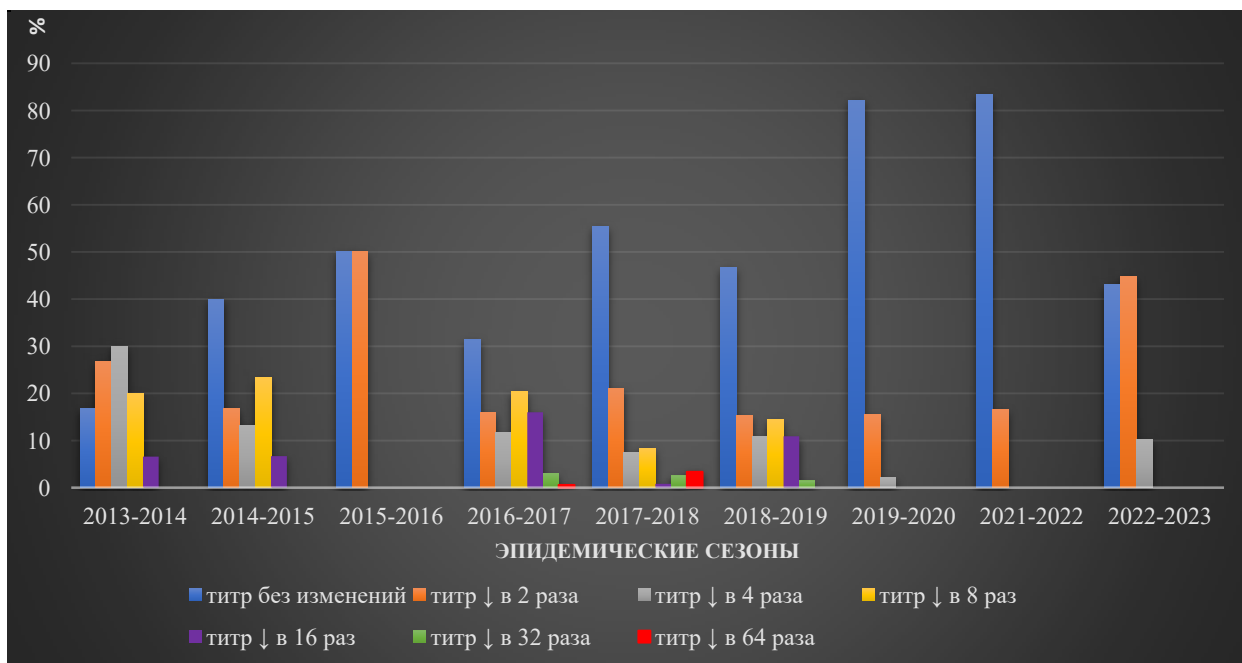
Среди вирусов, выделенных в 2013–2014 гг., 26,7 и 30 % вирусов демонстрировали падение ГА-титров в 2 и 4 раза соответственно в присутствии ингибитора. При этом 16,7 % протестированных штаммов сохраняли титры без изменений, а часть изолятов показали значительное снижение титра: в 8 раз — 20 %, в 16 раз — 6,6 % (см. рисунок).

В отличие от предыдущего сезона у большинства вирусов А(Н3N2) 2014–2015 гг. выделения при постановке РГА не наблюдалось падение титров в присутствии озельтамивира. Процентное соотношение вирусов, обладающих NA-индуцированной агглютинацией и соответственно снижающей титры в 8 и 16 раз, осталось на прежнем уровне.

Сезон 2015–2016 гг. характеризовался доминированием вирусов А(Н1N1)pdm09 и спорадическими случаями заболеваний, вызванных вирусом А(Н3N2) на территории России. Поскольку в этот период удалось выделить и проанализировать только шесть изолятов, у которых не наблюдалось значительное изменение ГА-титров в присутствии озельтамивира, выявить значимые закономерности не представляется возможным.

Из рисунка видно, что период 2016–2017 гг. характеризовался увеличением количества изолятов, у которых ГА-титр снижался в 16 раз (16 %) в присутствии ингибитора NA. Также были обнаружены вирусы, у которых титр падал в 32 раза (3,1 %) и в 64 раза (0,6 %). Возможно, в результате более длительного пассирования на линии MDCK у вирусов данного сезона с большей частотой накапливались минорные популяции с заменами в 148 и 151 положении, которые приводили к эффекту ложной агглютинации.

Начиная с 2018 г. появляется тенденция к увеличению количества изолятов, у которых гемагглютинирующий титр не изменяется в присутствии озельтамивира карбоксилата. Так, в этот сезон большинство (55.4 %) штаммов имели равный гемагглютинирующий титр в присутствии и отсутствии ингибитора. В последние сезоны данный показатель достигал 83.3 %.



Кратность падения гемагглютинирующих титров вирусов А(Н3N2), выделенных на клеточной культуре MDCK с 2013 по 2023 г., в присутствии буфера 20 нМ озельтамивира карбоксилата

Таким образом, можно сказать, что за период 2013–2017 гг. больше половины исследованных вирусов имели NA, способную связываться с рецепторами эритроцитов морской свинки и давать ложную агглютинацию, в связи с чем искажались результаты РГА. В сезоны 2019–2023 гг. у подавляющего большинства изолятов гемагглютинирующий титр не изменялся при добавлении ингибитора NA, что свидетельствует об отсутствии замен в 148 и 151 положении, что подтверждается данными генетического анализа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-237

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА
НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА 2022–2023 гг.**

**GENETIC CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN NOROVIRUS
INFECTION IN THE SVERDLOVSK REGION FOR 2022–2023**

Р. О. Быков, Т. М. Итани, В. И. Чалапа, П. К. Старикова, А. В. Семенов

*Федеральный научно-исследовательский институт
вирусных инфекций «Вирум» Роспотребнадзора, Екатеринбург*

R. O. Bykov, T. M. Itani, V. I. Chalapa, P. K. Starikova, A. V. Semenov

Federal Scientific Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg

✉ bykov_ro@niivirom.ru

Аннотация

Преобладающей группой в генотипической структуре норовирусов по всему миру является GII. Ранее на территории Свердловской области не проводился молекулярно-генетический мониторинг вместе с филогенетическим анализом, поэтому не предоставлялось возможным объективно оценить генетическое разнообразие и эволюционные события на уровне норовирусной популяции.

Abstract

The predominant group in the genotypic structure of noroviruses worldwide is GII. Previously, molecular genetic monitoring together with phylogenetic analysis was not carried out on the territory of the Sverdlovsk region, therefore it was not possible to objectively assess genetic diversity and evolutionary events at the level of the circulating norovirus strains.

Актуальность

В глобальном масштабе норовирусы являются причиной каждого пятого случая острого небактериального гастроэнтерита, и, по оценкам, ежегодно вызывают порядка 699 миллионов случаев заболевания и более 200 тыс. случаев смерти [1].

Генетическая группа GII вызывает более 50 % случаев вспышечной заболеваемости по всему миру. Преобладающим генотипом в генотипической структуре норовирусной инфекции человека (НВИ) является GII.4 [2]. Из-за высокой частоты рекомбинационной изменчивости каждые 2–3 года новые варианты GII.4 последовательно заменяют друг друга, быстро распространяясь среди населения всего мира. Использование унифицированной системы генотипирования норовирусов, последующий филогенетический анализ позволят в полной мере оценить генетическое разнообразие и события эволюционной дивергенции внутри вирусной популяции.

Цель работы — выполнить генотипирование и провести филогенетический анализ возбудителей НВИ на территории Свердловской области за 2022–2023 гг.

Материалы и методы

Был организован сбор образцов фекального материала от больных детей НВИ на территории Свердловской области. Все образцы были анализированы методом ПЦР с вырожденными праймерами, фланкирующими регион ORF1/ORF2 (Kojima et al, 2002). Определение нуклеотидных последовательностей участка генома возбудителей НВИ производилось методом секвенирования по Сэнгеру. Филогенетический анализ консенсусных последовательностей с построением аддитивных филограмм проводился в программе MEGA 11.

Результаты

С сентября по декабрь 2022 г. было исследовано n=220 образцов клинического материала. По результатам секвенирования удалось типировать 73 возбудителя НВИ, что составляет 33 % от общего объема исследованных образцов. В результате генотипирования по Сэнгеру установлено, что наибольший удельный вес приходится на геногруппу GII — n=42 (58 %), норовирусы GI — n=31 (42 %). Были выявлены различные генотипы возбу-

* Работа выполнена в рамках ГЗ-3/23 № 123051100045-0. Наименование НИОКТР: Мониторинг циркуляции и генетического разнообразия возбудителей норовирусной инфекции

© Р. О. Быков, Т. М. Итани, В. И. Чалапа, П. К. Старикова, А. В. Семенов, 2023

телей НВИ на территории отдельных муниципалитетов (рис. 1). В 2023 г. с января по июнь было исследовано $n=228$ образцов клинического материала. По результатам секвенирования удалось типировать 69 возбудителей НВИ. За анализируемый период выявленные норовирусы относятся ко второй геногруппе, за исключением двух редких генотипов, относящихся к GI.2. Наибольший удельный вес в структуре генотипического профиля GI.17 представлен норовирусам — GI.4 (54 %), GI.17 (23 %).

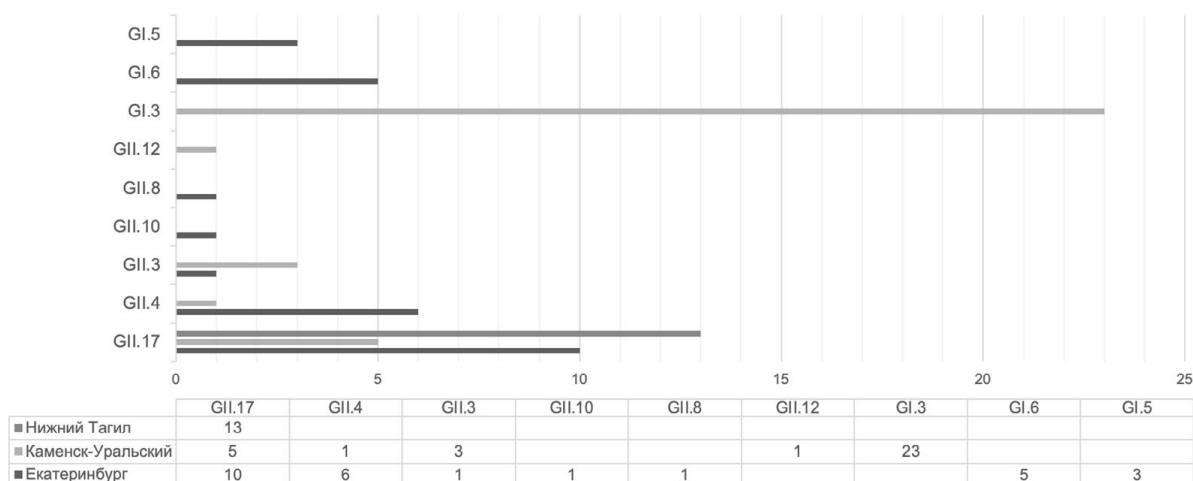


Рис. 1. Распределение выявленных генотипов в отдельных муниципалитетах Свердловской области за 2022 г.

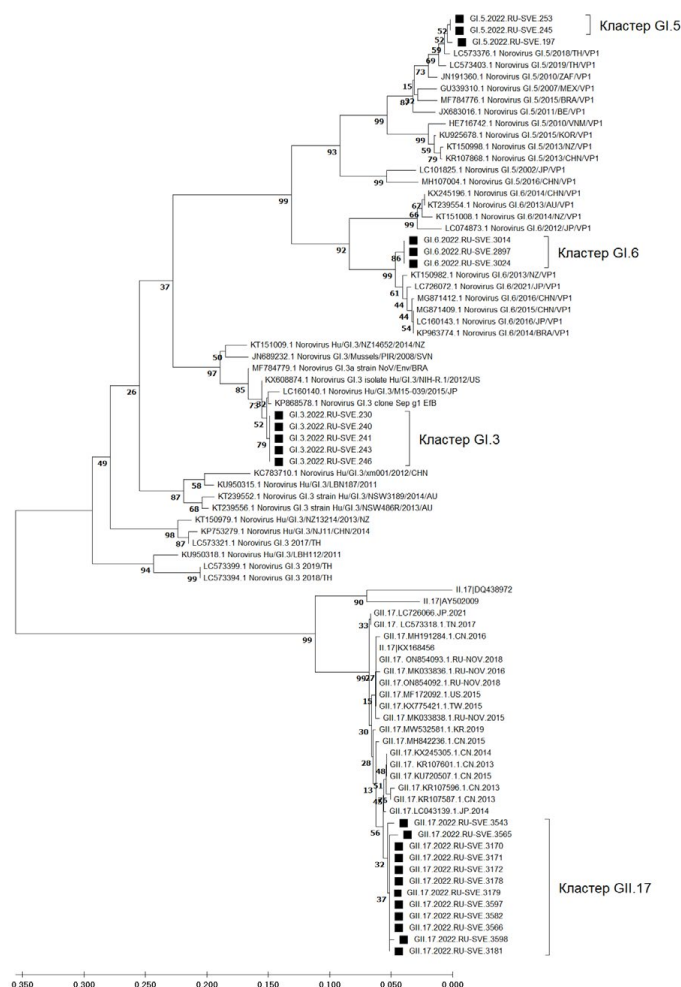


Рис. 2. Филогенетическое древо, основанное на фрагменте главного капсидного белка, построенное на основе нуклеотидных последовательностей норовирусных генотипов за 2022 г. GI.5, GI.6, GI.3, GII.17

При построении филогенетического дерева консенсусные последовательности GI и GII, выявленные на территории Свердловской области за 2022 г., формируют общие кластеры внутри каждого генотипа. Полученные кластеры образуют парафилиетические связи с изолятами из Китая, Японии, США, Южной Кореи и др. (рис. 2). Консенсусные последовательности GII.4, GII.17, GI.2, выявленные в Свердловской области за 2023 г., формируют парафилиетические связи с изолятами из Северной Кореи, Германии, Тайланда и др. (рис. 3).

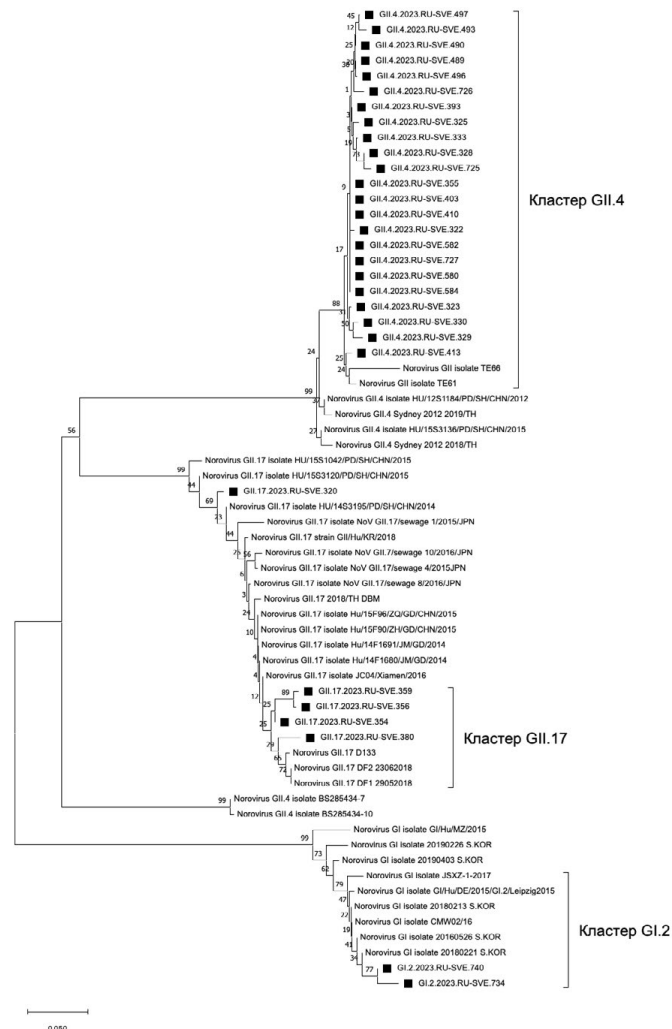


Рис. 3. Филогенетическое дерево, основанное на фрагменте главного капсидного белка, построенное на основе нуклеотидных последовательностей норвирусных генотипов за 2023 г. GII.4, GII.17, GI.2

Выводы

Впервые на территории Свердловской области был проведен генетический анализ возбудителей НВИ. Консенсусные последовательности выявленных норвирусов демонстрируют наименьшую генетическую дистанцию с изолятами из разных стран, что говорит об их убиквитарности. Организация надзорной деятельности за циркуляцией норвирусной популяции, секвенирование и филогенетический анализ последовательностей генома предоставят возможность анализировать возникшие гипотезы об общности источника возбудителя инфекции и определить возможные факторы передачи в очагах заболеваемости острым норвирусным гастроэнтеритом.

Литература

1. Patel M.M., Widdowson M.A., Glass R.I. et al. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis // *Emerging Infectious Diseases*. 2008. V.14. P. 1224-1231.
2. Lopman B.A., Steele D., Kirkwood C.D., Parashar U.D. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control // *PLOS Medicine*. 2016. V.13. P. e1001999.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-238

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАНДИДАТНОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА КАТАНГА-350 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE CANDIDATE VACCINE STRAIN KATANGA-350 OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS**

М. Е. Власов, Д. А. Кудряшов, О. Л. Колбасова, С. Ю. Моргунов,
Е. Ю. Пивова, В. И. Репин, Т. А. Севских, И. П. Синдрякова

Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский

M. E. Vlasov, D. A. Kudrjashov, O. L. Kolbasova, S. Yu. Morgunov,
E. Yu. Pivova, V. I. Repin, T. A. Sevskikh, I. P. Sindryakova

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky

✉ VlasovMikhail1993@yandex.ru

Аннотация

В данной работе представлены иммунобиологические характеристики кандидатного вакцинного штамма Катанга-350 вируса африканской чумы свиней.

Abstract

This study presents the immunobiological characteristics of the candidate vaccine strain Katanga-350 of African swine fever virus.

Африканская чума свиней (АЧС) — смертельная геморрагическая лихорадка свиней и евразийских диких кабанов. Болезнь протекает, как правило, в сверхострой, острой, подострой, реже в хронической формах. Начавшаяся в 2007 г. в Грузии пандемия АЧС, вызванная штаммами VIII сероиммунотипа и II генотипа, охватила уже 66 стран в основном на евразийском и африканском континентах. Общепринятых коммерческих вакцин против этой болезни нет. В значительной степени это связано с чрезвычайной гетерогенностью вируса АЧС по генетическим и иммунобиологическим свойствам. В частности, установлено 24 генотипа и по меньшей мере 9 сероиммунотипов.

Перспективы разработки средств специфической профилактики АЧС связаны с живыми аттенуированными или рекомбинантными вакцинами. Аттенуированные штаммы вируса АЧС способны вызывать защитные иммунные реакции у свиней, как правило, на гомологичные и в некоторых случаях на гетерологичные вирулентные изоляты и штаммы. В ряде случаев у свиней, инокулированных аттенуированными штаммами, развиваются неприемлемые клинические симптомы, такие как пневмония, поражения ЦНС, кожные язвы, аборт. Поэтому необходимо проводить разносторонние исследования кандидатных вакцинных штаммов.

Целью данной работы являлось изучение иммунобиологических свойств полученного в ФГБНУ ФИЦВиМ лабораторно аттенуированного штамма вируса АЧС Катанга-350 (I сероиммунотип, I генотип).

В первом эксперименте были исследованы иммунобиологические характеристики и параметры гомологичной и гетерологичной иммунной защиты у свиней, привитых штаммом Катанга-350 вируса АЧС в случае последовательного заражения сначала гомологичным вирулентным штаммом Лиссабон-57 (I сероиммунотип, I генотип) и гетерологичным — Ставрополь 01/08 (VIII сероиммунотип, II генотип). После внутримышечной прививки пяти свиней вирусом АЧС штамма Катанга-350 в дозе $10^{6.0}$ ГАЕ₅₀ у 80 % (4/5) свиней регистрировали вирусемию с 3 по 17 день в пределах $10^{1.0}$ – $10^{4.0}$ ГАЕ₅₀/мл. Показатели Ct в РТ-ПЦР составили 30–40 единиц в период с 3-го по 28-й день после введения. Вирусоспецифические антитела в сыворотках крови и слюне методом ТФ-ИФА выявляли, начиная с 7 по 12 день и до окончания эксперимента (78 день). Штамм Катанга-350 характеризовался как слабореактогенный, температурная реакция у отдельных свиней длилась от 1 до 5 дней и не превышала 41,0 °С, другие клинические признаки заболевания отсутствовали.

После заражения на 28 день у свиней, привитых штаммом Катанга-350, гомологичным вирулентным вирусом АЧС штамма Лиссабон-57 в дозе $10^{3.0}$ ГАЕ₅₀, защита от заболевания составила 60 % (3/5), от гибели — 80 % (4/5) свиней. На 42 день от начала эксперимента выживших животных заразили гетерологичным вирулентным штаммом Ставрополь 01/08 в дозе $10^{3.0}$ ГАЕ₅₀. Защита от заболевания составила 50 % (2/4), от гибели — 75 % (3/4).

Во втором эксперименте исследовали возможность формирования защиты свиней, привитых штаммом Катанга-350, от гетерологичного штамма Ставрополь 01/08. Десять привитых в дозе $10^{6,0}$ ГАЕ₅₀ и два контрольных (не привитых) свиней на 28 день заражали штаммом Ставрополь 01/08 в дозе $10^{3,0}$ ГАЕ₅₀. На 5–14 дни после заражения у всех животных отмечали вирусемию $10^{4,0}$ – $10^{7,0}$ ГАЕ₅₀/мл, повышение концентрации вирусной ДНК (St=20–30 единиц), как в пробах крови, так и слюны. На 7 и 8 дни после заражения контрольные животные погибли от острой формы АЧС, из десяти привитых шесть свиней пали в период с 9 до 17 день. Выжили четыре из десяти привитых свиней.

Таким образом, исследованный аттенуированный штамм вируса АЧС Катанга-350 безопасен для свиней: ни одно вакцинированное животное не достигло гуманной конечной точки (эвтаназии) и не умерло от причин, связанных с вакцинацией, среднее повышение температуры тела у всех привитых свиней не превысило 1,5 °С по сравнению с исходным уровнем, ни у одной свиньи не наблюдалось повышения температуры выше исходного уровня более чем на 2,5 °С в течение периода, превышающего 3 дня, отсутствовали типичные клинические признаки АЧС.

Уровни вирусемии у свиней, привитых штаммом Катанга-350, не превышали $10^{4,0}$ ГАЕ₅₀/мл. Это свидетельствует о развитии защитного иммунитета против вируса АЧС. После прививки свиней штаммом Катанга-350 процент защиты от гибели против гомологичного штамма (80 %) в два раза больше, чем против гетерологичного (40 %). Заражение привитых свиней вирусом АЧС гомологичного сероиммунотипа приводит к повышению процента защиты от гибели при последующем заражении гетерологичным вирулентным штаммом. Полученные результаты позволяют предложить штамм Катанга-350 в качестве кандидата для разработки вакцины против изолятов и штаммов вируса АЧС, относящихся к сероиммунотипу I.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-239

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ мРНК, КОДИРУЮЩИХ АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА А И К НУКЛЕОПРОТЕИНУ ВИРУСА ГРИППА В *IN VITRO****ANTIVIRAL ACTIVITY OF MRNAS ENCODING ANTIBODIES, TARGETING INFLUENZA A HEMAGGLUTININ AND INFLUENZA B NUCLEOPROTEIN *IN VITRO***

Н. В. Гаврилова^{1,2}, В. В. Высочинская^{1,2}, Е. А. Елпаева¹, О. А. Добровольская¹, М. А. Плотникова¹,
А. А. Ложков^{1,2}, Е. Л. Циммерман^{1,2}, А. А. Шалджян¹, Я. А. Забродская^{1,2}

¹НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

N. V. Gavrilova^{1,2}, V. V. Vysochinskaya^{1,2}, E. A. Elpaeva¹, O. A. Dobrovolskaya¹, M. A. Plotnikova¹,
A. A. Lozhkov^{1,2}, E. L. Zimmerman^{1,2}, A. A. Shaldzhyan¹, Y. A. Zabrodskaya^{1,2}

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

²Peter the Great Saint Petersburg Polytechnical University

✉ daughtervgater@gmail.com

Аннотация

Грипп является серьезной проблемой здравоохранения. Перспективным подходом для лечения гриппа являются терапевтические антитела. В данной работе созданы мРНК, кодирующие нейтрализующие антитела к гемагглютинирующему вирусу гриппа А, а также мРНК, кодирующие антитела к нуклеопротеину вируса гриппа В. Показана противовирусная активность мРНК-антител к гемагглютинирующему вирусу гриппа А *in vitro*.

Abstract

Influenza poses a significant public health concern, and the development of therapeutic antibodies provides a promising avenue for its treatment. In this study, we generated mRNA sequences encoding neutralizing antibodies targeting the hemagglutinin of influenza A virus, as well as antibodies specific to the nucleoprotein of influenza B virus. We successfully demonstrated the antiviral activity of mRNA-encoded antibodies targeting the hemagglutinin against influenza A virus *in vitro*.

Ответом организма на инфицирование вирусом гриппа или иммунизацию являются антитела. Антительный ответ в первую очередь нацелен на поверхностные белки вируса гриппа, в частности на гемагглютинин. В то же время аминокислотная последовательность поверхностных белков подвержена наибольшей изменчивости, что затрудняет создание универсальной вакцины от гриппа или терапевтического препарата, к которому не выработывалась бы устойчивость. Гемагглютинин вируса гриппа состоит из двух доменов: относительно консервативного стебля и вариабельной иммунодоминантной глобулярной головки. Ранее были описаны нейтрализующие антитела, направленные на консервативный участок гемагглютинина вируса гриппа А (Fi6) [1]. В данной работе в качестве потенциального терапевтического препарата были использованы специфические антитела, закодированные в форме мРНК. Подобная форма препарата позволяет получать сложные молекулы антител в нативной конформации без необходимости их выделения и очистки непосредственного в клетках или *in vivo*.

Плазмидные ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи Fi6, были любезно предоставлены лабораторией инженерии белка Института биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН. Нами были получены конструкции, пригодные для дальнейшего получения мРНК, кодирующие 1) секретируемую форму Fi6, а также 2) секретируемую форму антител к нуклеопротеину вируса гриппа В (2/3) и 3) несекретируемые Fab-фрагменты 2/3. Для легких и для тяжелых цепей были получены разные конструкции. Методом *in vitro* транскрипции были получены соответствующие мРНК (мРНК-Fi6, мРНК-2/3 и мРНК-Fab-2/3). мРНК-Fi6 и мРНК-2/3 были доставлены в клетки MDCK при помощи коммерческого реагента липофектамин, а также при помощи оригинальных липосом 2x3-DOPE 1:3 [2]. Методом флуоресцентной микроскопии через 24 часа после трансфекции было показано накопление целевых антител в клетках, аналогично накопление антител в супернатантах было показано с помощью иммуноферментного анализа (ELISA).

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 056-00012-23-01 от 27.02.2023 (тема рег. № НИОКТР в ЕГИСУ НИОКТР 1121052400146-0 «Исследование противовирусного потенциала препарата на основе мРНК, кодирующих антитела к нуклеопротеину вируса гриппа»).

© Н. В. Гаврилова, В. В. Высочинская, Е. А. Елпаева, О. А. Добровольская, М. А. Плотникова, А. А. Ложков, Е. Л. Циммерман, А. А. Шалджян, Я. А. Забродская, 2023

Для демонстрации специфической активности антител, кодируемых мРНК, были получены клетки CHO, стабильно экспрессирующие антитела F16 и 2/3. Антитела из супернатантов клеток были очищены методом аффинной хроматографии. Методами вестерн-блоттинга и ELISA было показано, что выделенные антитела F16 и 2/3 связываются с гемагглютинином вируса гриппа А различных подтипов и с нуклеопротеином вируса гриппа В соответственно.

Противовирусная активность мРНК-F16 была исследована в двух схемах введения (лечебная и профилактическая) при заражении клеток MDCK вирусом гриппа А/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Было показано, что мРНК-F16 обладают наиболее выраженной противовирусной активностью через 24 часа при применении в профилактической схеме введения по данным РГА супернатантов и ELISA In-cell с антителами к нуклеопротеину вируса гриппа А. Следует отметить, что в лечебной схеме антитела также снижали репликацию вируса гриппа, однако менее выражено, чем в профилактической. В дальнейшем планируется установить наличие противовирусной активности мРНК-Fab-2/3 в отношении вирусов гриппа В викторианской и ямагатской линий, а также выяснить, насколько универсальным является действие мРНК-F16 на панели вирусов гриппа А различных подтипов.

Таким образом, были созданы и охарактеризованы мРНК, кодирующие антитела к гемагглюнину вируса гриппа А и нуклеопротеину вируса гриппа В. Было показано, что такие мРНК обладают трансляционной активностью, достаточной для реализации их противовирусного эффекта и в перспективе могут быть исследованы *in vivo* в качестве потенциального терапевтического препарата на модели гриппозной инфекции у мышей.

Литература

1. Corti D. et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins // *Science*. 2011. V.333. P. 850-856.
2. Vysochinskaya V. et al. Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells // *Pharmaceutics*. 2022. V. 15. P. 8.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-240

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА 2 СЕРОТИПА ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ*

EVALUATION OF FUNCTIONALITY OF GENETIC CONSTRUCTS BASED ON ADENO-ASSOCIATED VIRUS SEROTYPE 2 FOR THE DELIVERY OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS GENES INTO MAMMALIAN CELLS

А. Г. Галеева^{1,2}, Г. С. Фролов¹, Д. А. Зубринкин¹

¹Казанская государственная академия ветеринарной медицины

²Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности — Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт, Казань

A. G. Galeeva^{1,2}, G. S. Frolov¹, D. A. Zubrinkin¹

¹Kazan State Academy of Veterinary Medicine

²Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety — All-Russian Research Veterinary Institute, Kazan

✉ antonina-95@yandex.ru

Аннотация

Приведены результаты оценки функциональности бицистронных конструкций на основе аденоассоциированного вектора (AAV2), содержащих гены *B646L-CP530R* и *E183L-CP204L* вируса АЧС. Было установлено, что AAV2 способны эффективно трансдуцировать клетки эмбриональных почек свиньи (SPEV) и индуцировать коэкспрессию цистронов, что подтверждается наличием соответствующих зрелых белков — p72, pp62, p54, p30 в культуральном лизате через 48–72 ч после трансдукции.

Abstract

The results of evaluating the functionality of bicistronic constructs based on the adeno-associated vector (AAV2) containing ASF virus *B646L-CP530R* and *E183L-CP204L* genes are presented. It was found that AAV2 is able to efficiently transduce porcine embryonic kidney (SPEV) cells and induce co-expression of cistrons, which is confirmed by the presence of the corresponding mature proteins — p72, pp62, p54, p30 in the culture lysate 48–72 h after transduction.

Африканская чума свиней (АЧС) — высококонтагиозная вирусная болезнь представителей семейства *Suidae*, смертность в первичных очагах которой достигает 100 %. Широкое распространение и колоссальные экономические убытки от АЧС оказали влияние на развитие животноводства большинства стран Африки и Европы [1]. До сегодняшнего дня средства специфической профилактики АЧС не разработаны. Несмотря на то что исследователями предложены различные методы создания кандидатных вакцин против АЧС, до сих пор актуален вопрос разработки альтернативных антигенных вариантов, обладающих низкой реактогенностью и высокой иммуногенностью. Подобными свойствами обладает аденоассоциированный вирус 2 серотипа (AAV2), который, на наш взгляд, является перспективной платформой для конструирования векторной вакцины против АЧС [2]. В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка функциональности генетических конструкций на основе AAV2 для доставки генов вируса АЧС в клетки организма-хозяина.

Нами были созданы две бицистронных генетических конструкции на основе вектора rAAV-MCS, в которых были попарно объединены гены *B646L-CP530R* и *E183L-CP204L* вируса АЧС, которые, согласно данным Goatley et al. [3], ранее демонстрировали высокую протективную эффективность в составе кандидатной вакцины на основе аденовируса человека 5 серотипа. Сборку рекомбинантного AAV2 осуществляли путем котрансфекции клеточной линии AAV293 («Agilent Technologies», США) плазмидами с трансгенами, а также упаковочной и оболочечной плазмидами (AAV-RepCap, pHelper). Накопление титров rAAV2 контролировали через 48–72 ч в количественной ПЦР с праймерами, фланкирующими инвертированные концевые повторы (ITR) AAV2, предварительно обработав образцы бензонуклеазой для удаления неинкапсидированной ДНК. Для оценки функциональности конструкций клетки линии SPEV трансдуцировали rAAV2, предварительно сконцентрированными в градиенте плотности йодиксанола, при множественности инфицирования (MOI) 5000. Эффективность

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-76-00013.

трандукции оценивали через 48–72 ч по уровню содержания в образцах соответствующих мРНК. Наличие целевых зрелых белков в клеточных лизатах устанавливали в аналитическом disc-электрофорезе, их специфичность подтверждали вестерн-блоттингом с сывороткой свиньи, иммунизированной цельновирионным вирусом АЧС (ФГБНУ «ФИЦВиМ», Россия).

Результаты исследований продемонстрировали, что применяемый протокол сборки rAAV2 позволяет получить очищенный лабораторный образец с концентрацией не менее 10^{11} вирусных частиц на мл культуральной жидкости. Установлено, что rAAV2 позволяет эффективно трансдуцировать клетки линии SPEV: помимо визуального контроля образцов, трансдуцированных rAAV-MCS с геном дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S, в образцах регистрировались достаточно высокие уровни мРНК (в среднем от 8,7 до 9,2 млн копий целевого гена на 1 мкг суммарной РНК). Также было отмечено, что уровни экспрессии вышестоящих цистронов превышали таковые нижестоящих цистронов в среднем на $(33,6 \pm 4,7)$ %, однако во всех образцах было зафиксировано наличие целевых белков с расчетными молекулярными массами, специфичность которых подтверждалась в вестерн-блоттинге.

Представленные результаты демонстрируют функциональность бицистронных конструкций на основе AAV2: факт экспрессии обоих цистронов в клетках целевых животных в перспективе позволит осуществлять коэкспрессию изучаемых антигенов *in vivo*. rAAV2, содержащие различные комбинации целевых генов, были наработаны в препаративных количествах для дальнейшей оценки их функциональности *in vivo*. Таким образом, в ходе проведенных исследований была показана возможность применения генетических конструкций на основе AAV2 для доставки генов вируса АЧС *in vitro*, оценена эффективность и специфичность экспрессии трансгенов, что в дальнейшем позволит предложить альтернативу существующим вирус-векторным кандидатным вакцинам.

Литература

1. Колбасов Д. В. Африканская чума свиней: создание вакцины актуально // Животноводство России. 2020. № 7. С. 29-33.
2. Ravilov R. K., Rizvanov A. A., Mingaleev D. N., Galeeva A. G., Zakirova E. Yu., Shuralev E. A., Rutland C. S., Khammatov N. I., Efimova M. A. Viral Vector Vaccine Against ASF: Problems and Prospectives // Frontiers in Veterinary Science. 2022. V. 9. 830244.
3. Goatley L. C., Reis A. L., Portugal R., Goldswain H., Shimmon G. L., Hargreaves Z., Ho C., Montoya M., Sanchez-Cordon P., Taylor G., Dixon L. K., Netherton C. L. A Pool of Eight Virally Vected African Swine Fever Antigens Protect Pigs Against Fatal Disease // Vaccines (Basel). 2020. V. 8(2). 234.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-241

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ
С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПРАЙМЕРНОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

**DETERMINATION OF THE ANALYTICAL SENSITIVITY OF RESEARCH WITH MULTIPLEX PRIMER
PANEL FOR THE DETECTION OF NUCLEIC ACIDS OF RESPIRATORY VIRAL PATHOGENS
BY USING HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING**

Д. А. Григорян, И. Ф. Стеценко, А. Д. Мацвай, Г. А. Шипулин

*Центр стратегического планирования и управления
медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва*

D.A. Grigoryan, I.F. Stetsenko, A.D. Matsvai, G.A. Shipulin

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA of Russia, Moscow

✉ grigoryand220@gmail.com

Аннотация

В исследовании определялась аналитическая чувствительность исследования мультиплексной праймерной панелью для целевого обогащения нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных заболеваний. Предел обнаружения был определен для 23 видов вирусов, включая вирусы гриппа, вирусы парагриппа, коронавирусы, аденовирусы, энтеровирусы, респираторно-синцитиальные вирусы.

Abstract

The research determined the analytical sensitivity of the multiplex primer panel for targeted enrichment of nucleic acids of pathogens of acute respiratory viral diseases. The limit of detection was determined for 23 types of viruses, including influenza viruses, parainfluenza viruses, coronaviruses, adenoviruses, enteroviruses, respiratory syncytial viruses.

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) — наиболее распространенная группа инфекций и основная причина сезонных вспышек заболеваемости. Респираторные инфекции вызывают такие вирусы, как коронавирусы, энтеровирусы, респираторно-синцитиальные вирусы, вирусы гриппа, парагриппа, аденовирусы. Современные методы диагностики и идентификации возбудителей ОРВИ открывают широкие возможности для борьбы с сезонными респираторными заболеваниями.

Нами ранее был разработан подход к дизайну мультипраймерных панелей для проведения широкого скрининга вирусных инфекций, в частности, группы возбудителей инфекций, вызывающих заболевания органов дыхательной системы.

Целью работы было определение аналитической чувствительности мультиплексной праймерной панели олигонуклеотидов для целевого обогащения нуклеиновых кислот вирусных патогенов с последующим высокопроизводительным секвенированием.

Материалы и методы

В исследовании применялся контрольный материал, содержащий нуклеиновые кислоты вирусных патогенов, вызывающих респираторные вирусные заболевания в количестве 23 различных видов. Для каждого вида вирусов был получен продукт, содержащий локусы отжига целевых праймеров, копияность которого была оценена с использованием капиллярного электрофореза на чипе, на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer. Далее осуществлялась серия 10-кратных разведений, которые проводились в двух вариациях: в деионизированной воде (mQ) и в экстракте нуклеиновых кислот ротоглоточного мазка, полученного от человека (swab). После этого с использованием тестируемой панели олигонуклеотидов было проведено целевое обогащение разведенных образцов с копияностью $5 \cdot 10^7$ – $5 \cdot 10^3$ м.к./мл.

Все этапы амплификации проводилась с использованием термостабильной TaqF-полимеразы с «горячим стартом». Очистка амплификатов проводилась магнитными частицами Kara PureBeads. Приготовление библиотек для высокопроизводительного секвенирования включало: фосфорилирование 5'-ОН конца двухцепочечных ДНК-фрагментов с использованием фермента полинуклеотидкиназы, лигирование универсальных Y-образных адаптеров и индексация методом ПЦР, в ходе которой каждому образцу присваивалась уникальная комбинация индексов при помощи праймеров, содержащих последовательность баркода. Высокопроизводительное секвенирование проведено на платформе Miseq (Illumina) с получением парноконцевых прочтений длиной 250 п.о. Валидными считались данные, превышающие нижнее пороговое значение — 0,2 %.

По результатам анализа данных секвенирования была установлена аналитическая чувствительность исследования для 23 видов вирусов (см. таблицу). Для групп энтеровирусов и риновирусов аналитическая чувствительность системы составляет $5 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^5$ м.к./мл. Наилучший показатель чувствительности — для полиомавируса, пареховируса, респировируса 3 типа, ортопневмовируса, а также для вируса гриппа А, мастаденовируса В и коронавируса HKU1 ($5 \cdot 10^3$ – $5 \cdot 10^4$ м.к./мл). Средний уровень чувствительности коронавируса NL63, коронавируса 229E и SARS-CoV2 составляет $5 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^5$ м.к./мл. Наименьший уровень аналитической чувствительности исследования был определен для мастаденовируса С – $5 \cdot 10^5$ м.к./мл для образца в mQ, и $5 \cdot 10^6$ м.к./мл — в ротоглоточном мазке.

Аналитическая чувствительность исследования с применением мультиплексной праймерной панели

Вид вируса	Аналитическая чувствительность в mQ, копий/мл	Аналитическая чувствительность в swab, копий/мл
<i>Rhinovirus A</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
<i>Rhinovirus B</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$
<i>Rhinovirus C</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$
<i>Enterovirus B</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$
<i>Enterovirus C</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$
<i>Human polyomavirus 3</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<i>Human bocavirus</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
<i>Human coronavirus HKU1</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<i>Human coronavirus NL63</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
<i>Human coronavirus 229E</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
<i>Human mastadenovirus B</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<i>Human mastadenovirus C</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^6$
<i>Human metapneumovirus</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$
<i>Human orthopneumovirus</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<i>Parechovirus A</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<i>Human respirovirus 1</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
<i>Human respirovirus 3</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^5$
<i>Human rubulavirus 2</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
<i>Human rubulavirus 4</i>	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$
<i>Influenza A virus</i>	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
<i>Influenza B virus</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$
<i>Measles morbillivirus</i>	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$

Заключение

В ходе эксперимента была определена аналитическая чувствительность исследования мультиплексной праймерной панелью, предназначенной для целевого обогащения нуклеиновых кислот патогенных вирусов, вызывающих респираторные заболевания, составившая от $5 \cdot 10^3$ м.к./мл до $5 \cdot 10^5$ м.к./мл для исследований в mQ и от $5 \cdot 10^3$ м.к./мл до $5 \cdot 10^6$ м.к./мл — в ротоглоточном мазке.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-242

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АДЕНОВИРУСОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ
ГБУЗ НСО «ДГКБ № 3» Г. НОВОСИБИРСКА С ДИАГНОЗОМ ОРЗ****GENETIC DIVERSITY OF ADENOVIRUSES AMONG ARI PATIENTS OF THE NOVOSIBIRSK CCCH № 3**

Д. С. Демина¹, С. Б. Бердиева¹, И. Д. Осипов¹, Д. Е. Маслов¹, Т. В. Комиссарова³,
В. В. Макуха³, Ю. Э. Томилова², Э. Ф. Аглетдинов², С. В. Нетёсов¹

¹Новосибирский государственный университет

²АО «Вектор-Бест», Новосибирск

³Детская городская клиническая больница № 3 г. Новосибирска (ДГКБ № 3)

D. S. Demina¹, S. B. Berdieva¹, I. D. Osipov¹, D. E. Maslov¹, T. V. Komissarova³,
V. V. Makukha³, Yu. E. Tomilova², E. F. Agletdinov², S. V. Netesov¹

¹Novosibirsk State University

²Vector-Best, JSC, Novosibirsk

³Children's Novosibirsk City Clinical Hospital No. 3

✉ d.demina@g.nsu.ru

Аннотация

Представленность серотипов респираторных аденовирусов на территории Новосибирской области до сих пор была неизученной, между тем мониторинг циркулирующих типов аденовирусов важен для анализа и контроля вспышек ОРЗ и разработки векторов для доставки генов с целью профилактики и лечения заболеваний. Мы разработали схему для определения серотипов аденовирусов и провели анализ их встречаемости среди пациентов ДГКБ № 3. Серотипы аденовирусов 1, 2, 3 и 7 были обнаружены у 80 % пациентов с подтвержденной аденовирусной инфекцией.

Abstract

The monitoring of circulating adenoviruses is important for the control of ARI outbreaks and the development of vectors for gene delivery for disease prophylaxis and treatment. However, the diversity of adenoviruses in the Novosibirsk region remained poorly understood. We developed a scheme for genotyping of adenoviruses and analyzed their occurrence among patients of Children's City Clinical Hospital No. 3. Adenovirus serotypes 1, 2, 3 and 7 were found in 80 % of patients with confirmed adenovirus infection.

Аденовирусы — это ДНК-вирусы, поражающие различные группы позвоночных животных. Представители рода *Mastadenovirus* вызывают заболевания у человека, обезьян, лошадей, мышей и других млекопитающих. Среди способных поражать человека выделяют 7 видов (А-Г) [1], 3 из которых (В, С и Е) являются основными возбудителями ОРЗ среди аденовирусов [2]. Самыми патогенными серотипами являются 3 и 7 (вид В), а также 4 (вид Е) [3, 4]. В последние годы в мире проводится разработка различных профилактических и терапевтических препаратов на основе аденовирусных векторов, эффективность которых может быть сильно снижена предсуществующим иммунитетом пациента против вектора.

Для разработки генотипирующей схемы необходимо выбрать высокоизменчивые районы геномной ДНК, которые граничат с очень консервативными последовательностями для успешной посадки праймеров. Исторически деление аденовирусов по серотипам внутри вида проводилось по их серологическим свойствам, за которые ответственны поверхностные белки капсида (гексон, пентон и фибер). С развитием молекулярно-генетических методов классификация (генотипирование) стала проводиться по генам этих белков. Исходное выявление производилось нами путем проведения ПЦР с использованием праймеров на более консервативный ген пентона тест-системой РеалБест-ОРВИ ДНК hAdV/hBoV компании Вектор-Бест.

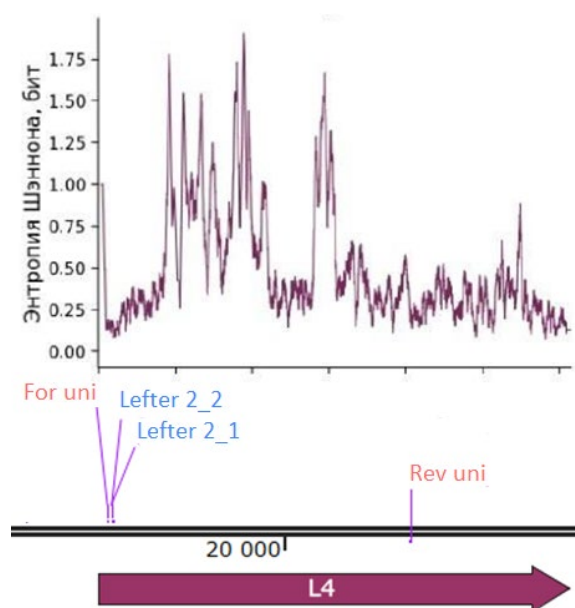
Для генотипирования нами были подобраны праймеры на консервативные области вокруг варибельной части гена гексона для получения копий ДНК-фрагмента с целью последующего секвенирования универсальными праймерами (см. рисунок).

Протокол данного исследования прошел все необходимые этические процедуры, и было получено информированное согласие родителей детей ДГКБ № 3.

Было взято 1974 пробы от детей, больных ОРЗ. Генная ДНК аденовирусов была выявлена методом ПЦР в 202 пробах с помощью праймеров, подобранных на ген пентона, что составляет 10,2 %. Из этих проб с использованием секвенирования по Сэнгеру (ABI 3500 DNA Analyzer) варибельной части гена гексона удалось определить серотипы для 55 проб. Результаты представлены в таблице.

Количественное распределение серотипов аденовируса человека в проанализированных пробах

Вид аденовируса	Серотип аденовируса	Количество проб	Доля (%)
Вид В	3	11	20
	7	11	20
	55	1	1,8
	Не определен	1	1,8
Вид С	1	9	16,4
	2	13	23,6
	5	4	7,3
	6	1	1,8
	Не определен	1	1,8
Вид Е	4	3	5,5



Профиль изменчивости кодирующей последовательности аденовирусного гексона с отметками мест посадки праймеров для получения ДНК-фрагментов, содержащих гипервариабельные районы гена гексона (синие) и универсальных секвенирующих праймеров (красные)

Заключение

Аденовирусы являются причиной серьезных ОРЗ среди детей в Новосибирске в более чем 10 % случаев. Среди них наибольшая встречаемость наблюдалась для мастаденовирусов видов В и С и серотипов 1, 2, 3, 7, в сумме они составили 80 % от всех случаев аденовирусной инфекции. Наиболее редкими среди выявленных являются 6 и 55 серотипы, поэтому они могут быть использованы для разработки рекомбинантных вакцин и онколитических аденовирусов. В дальнейшем предполагается продолжение исследования представленности различных серотипов аденовирусов, отслеживание динамики изменений и расширение географии исследования.

Литература

1. Adenoviridae: <https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae> (access: 22.05.2023) .
2. MacLachlan N. J. et al. Fenner's veterinary virology: Fifth edition // Fenner's Veterinary Virology: Fifth Edition. Elsevier Inc., 2016. 1–581 p.
3. Adenovirus Vaccine Information Statement | CDC [Electronic resource]. URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/adenovirus.html> (access: 23.05.2023)
4. Wang Y.F. et al. Molecular epidemiology and clinical manifestations of adenovirus respiratory infections in Taiwanese children.// Medicine (Baltimore, USA). -2016. Vol. 95, № 18. P. e3577

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-243

ВИРУСНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ: ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *SEADORNAVIRUS* В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ***VIRAL DIVERSITY OF WILD WATER BIRDS: THE FIRST DETECTION OF *SEADORNAVIRUS* VARIANTS IN WESTERN SIBERIA**Н. А. Дубовицкий¹, А. А. Дёрко¹, А. М. Логинова¹, А. А. Хозяинова²,
О. Р. Друзяка¹, А. М. Шестопалов¹, К. А. Шаршов¹¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск²Научно-исследовательский институт онкологии,

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

N.A. Dubovitskiy¹, A.A. Derko¹, A.M. Loginova¹, A.A. Khozyainova²,
O.R. Druzyaka¹, A.M. Shestopalov¹, K.A. Sharshov¹¹Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS

✉ nikitadubovitskiy@gmail.com

Аннотация

В ходе исследования вирусного разнообразия кишечника птиц семейства *Anatidae* в Новосибирской области в 2022 г. мы обнаружили вирусы семейств *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Parvoviridae*, *Astroviridae*, *Sedoreoviridae*. Впервые в России мы обнаружили нуклеотидные последовательности представителей рода *Seadornavirus*, переносчиками которых являются комары.

Abstract

We found *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Parvoviridae*, *Astroviridae*, *Sedoreoviridae* viruses during the study of viral diversity of gut of *Anatidae* species. For the first time in Russia, we detected nucleotide sequences of mosquito-borne viruses of *Seadornavirus* genus.

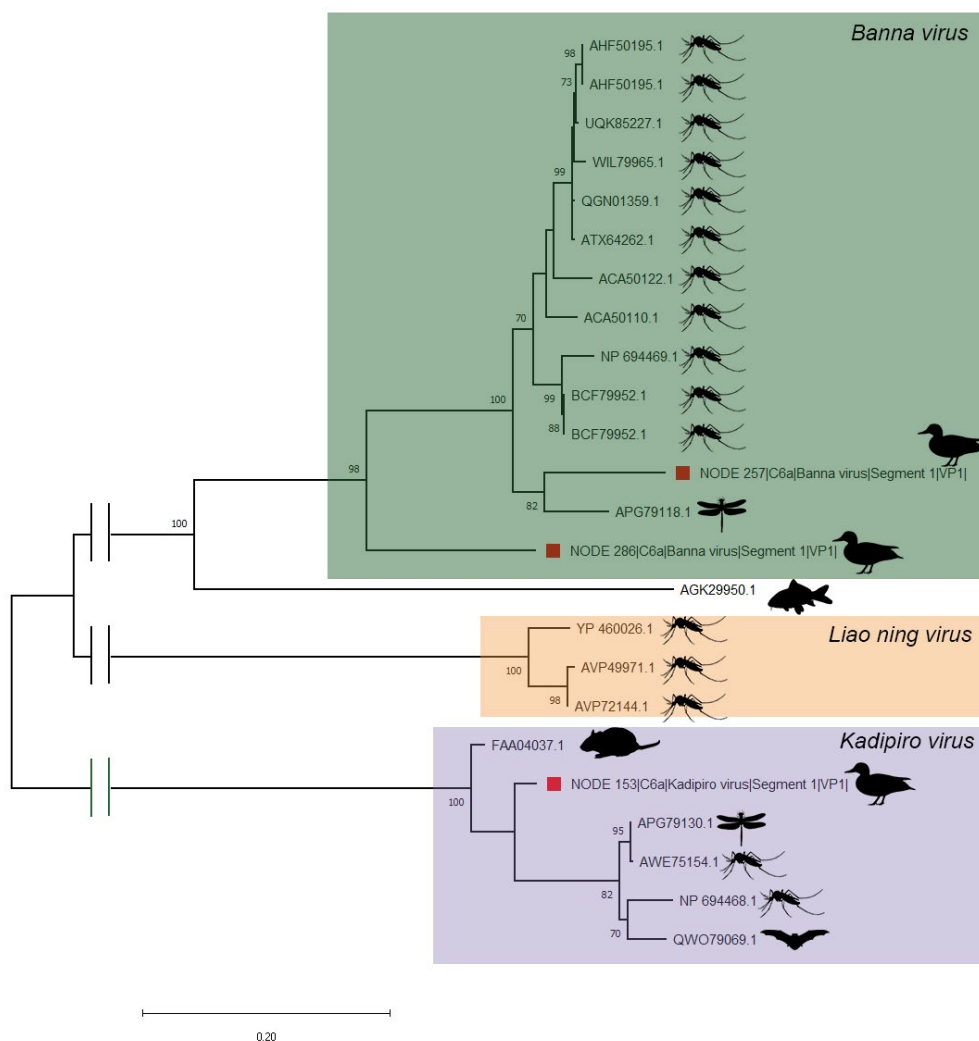
Птицы являются резервуаром для большого разнообразия вирусов, включая зоонозные варианты вирусов. С появлением подходов к изучению вирусного разнообразия при помощи метагеномики было обнаружено существенное разнообразие вирусов у птиц. Так, за последнее десятилетие количество известных вирусов, инфицирующих птиц, возросло по меньшей мере в три раза. Проведенное в Китае масштабное исследование в 2022 г. среди 3182 птиц позволило выявить вирусы семейств *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* и др. [1]. Территории водно-болотных угодий Западной Сибири входят в зону трех миграционных пролетных путей диких водоплавающих птиц: Черноморско-Средиземноморского, Западноазиатского-Восточноафриканского и Центрально-Азиатского. Птицы различных популяций ежегодно совершают миграции и образуют скопления в местах гнездования в Западной Сибири. Так, циркуляция вирусов гриппа А, парамиксовирусов и коронавирусов обнаружена у диких водоплавающих птиц на данных территориях [2]. Эти данные подчеркивают важность проведения метагеномного исследования вирусов птиц на данной территории.

Для проведения исследования образцы клоакальных мазков и образцы фекалий были собраны от птиц в Карасукском, Баганском и Убинском районе Новосибирской области. Всего было собрано 32 образца от следующих видов: чирок-свиистунок (*Anas crecca*), кряква (*Anas platyrhynchos*), красноголовый нырок (*Aythya ferina*) и савка (*Oxyura leucocephala*). Далее из образцов фекалий подготавливалась 10 % суспензия с использованием фосфатно-солевого буфера, и производилось обогащение проб вирусоподобными частицами для сформированных пулов по протоколу NetoVir [3]. Секвенирование проводилось с использованием Genolab M (Genemind, Китай) с получением прочтений 2x150.

В результате было получено большое разнообразие последовательностей вирусов про- и эукариот. ДНК-вирусы представлены широким разнообразием представителей семейства *Parvoviridae*. Среди РНК-вирусов множество последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) были отнесены к семейству *Picornaviridae*. В кишечном вируме савок обнаружен папилломавирус, филогенетически близкий к утиным папилломавирусам. Примечательно значительное разнообразие представителей рода *Seadornavirus*, выявленных у особей *Anas crecca*. Выявлено 3 последовательности RdRp двух различных видов: *Banna virus* и *Kadipiro virus* (см. рисунок).

* Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ФТМ (тема 122012400086-2) и при поддержке гранта РФФИ 23-44-00026.

© Н. А. Дубовицкий, А. А. Дёрко, А. М. Логинова, А. А. Хозяинова, О. Р. Друзяка, А. М. Шестопалов, К. А. Шаршов, 2023



Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей RdRp рода *Seadornavirus*.
Красный маркер — последовательности исследования

Аминокислотная последовательность первой RdRp *Banna virus*, обнаруженной в ходе исследования, филогенетически наиболее тесно связана с вирусом, обнаруженным у стрекоз в ходе исследования вирусов у насекомых в Китае. Попарные дистанции для двух обнаруженных аминокислотных последовательностей относительно аминокислотной последовательности RdRp *Banna virus*, обнаруженного у стрекоз, — 0,13 и 0,24. Впервые *Banna virus* был выделен в Китае в 1987 г. из сыворотки и спинномозговой жидкости людей с лихорадкой неясной этиологии и энцефалитом [4]. Виды *Kadipiro virus* и *Banna virus* рода *Seadornavirus* являются объектом мониторинга у комаров в странах Юго-Восточной Азии. Метагеномные исследования вирусов наряду с поиском вирусов в базах данных транскриптомных исследований позволили выявить представителей *Seadornavirus* у летучих мышей, карпа и стрекоз. Мы предполагаем, что присутствие вирусов насекомых в кишечном вироме у уток связано с питанием. Проведение поисков *Banna virus* и других представителей *Seadornavirus* среди наиболее вероятных хозяев, наряду с получением изолятов и изучением биологических свойств, является важной задачей для следующих исследований на территории Западной Сибири.

Литература

1. Shan T., Yang S., Wang H., et al. Virome in the cloaca of wild and breeding birds revealed a diversity of significant viruses // *Microbiome*. 2022. Vol. 10, № 1. P. 60.
2. Sharshov K., Dubovitskiy N., Derko A., et al. Does Avian Coronavirus Co-Circulate with Avian Paramyxovirus and Avian Influenza Virus in Wild Ducks in Siberia? 5 // *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 15, № 5. P. 1121.
3. Conceição-Neto N., Yinda K.C., Van Ranst M., et al. NetoVIR: Modular Approach to Customize Sample Preparation Procedures for Viral Metagenomics // *The Human Virome: Methods and Protocols* / ed. Moya A., Pérez Brocal V. New York, NY: Springer, 2018. P. 85–95.
4. Xu P.T., Wang Y.M., Zuo J.M., et al. New orbiviruses isolated from patients with unknown fever and encephalitis in Yunnan Province. // *Chin. J. Virol.* 1990. Vol. 6, № 1. P. 27–33.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-244

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ-РЕАССОРТАНТ ВИРУСА ГРИППА А,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ФРАГМЕНТ RBD ГЛИКОПРОТЕИНА SPIKE
КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2**

**RECOMBINANT INFLUENZA A VIRUS REASSORTANT VACCINE STRAIN EXPRESSING MODIFIED
RBD FRAGMENT OF SARS-COV-2 CORONAVIRUS SPIKE GLYCOPROTEIN**

Э. В. Дубровская^{1,2}, Д. И. Ивкина¹, А. Р. Иматдинов¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
²Новосибирский государственный университет

E. V. Dubrovskaya^{1,2}, D. I. Ivkina¹, A. R. Imatdinov¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo
²Novosibirsk State University

✉ elina_du@mail.ru

Аннотация

Вирус гриппа А и вирус SARS-CoV-2 обладают высоким пандемическим потенциалом. Вакцинация — эффективный метод профилактики, но существующие вакцины не могут быть быстро актуализированы в соответствии с циркулирующими вариантами вирусов. В данной работе описан рекомбинантный штамм-реассортант вируса гриппа А, экспрессирующий тримеризованный RBD SARS-CoV-2, который может быть использован в качестве компонента кандидатных мультивалентных вакцин.

Abstract

Influenza A virus and SARS-CoV-2 virus have a high pandemic potential. Vaccination is an effective method of prevention, but existing vaccines cannot be quickly updated to match circulating virus variants. This paper describes a recombinant reassortant strain of influenza A virus expressing SARS-CoV-2 trimerized RBD, which can be used as a component of candidate multivalent vaccines.

Пандемия COVID-19, вызванная ранее неизвестным бетакоронавирусом SARS-CoV-2, затронула подавляющее большинство стран в мире. При этом SARS-CoV-2 и вирусы гриппа вызывают острые респираторные инфекции со схожими симптомами. Так же, как и SARS-CoV-2, вирусы гриппа А представляют постоянную глобальную угрозу для человечества. Из-за восприимчивости большого числа видов птиц и млекопитающих, а также вследствие непрерывной эволюции, связанной с антигенным дрейфом и сдвигом, ортомиксовирусы вызывают повторяющиеся и непредсказуемые пандемии. Вакцинация считается наиболее эффективным методом профилактики гриппа и COVID-19, в связи с чем требуется разработка и актуализация комплексных решений.

В рамках данной работы методами обратной генетики получен рекомбинантный штамм-реассортант вируса гриппа А, обеспечивающий экспрессию антигенов вируса гриппа А и фрагмента гликопротеина Spike вируса SARS-CoV-2.

Для получения рекомбинантного вируса, экспрессирующего RBD SARS-CoV-2, с использованием методов обратной генетики использованы 8 плазмидных конструкций, кодирующих нативные либо модифицированные сегменты генома вируса гриппа А. Неизменяемые компоненты представлены пятью плазмидами, содержащими кДНК копии вирусных сегментов (1, 2, 3, 5 и 7) холодоадаптированного штамма гриппа А/Leningrad/134/17/57 (*ca, ts, att*), полученных ранее синтезом *de novo*, а также двух переменных конструкций, кодирующих 4-й и 6-й сегменты генома вируса гриппа А/Wisconsin/588/2019 (H1N1), рекомендованный для производства противогриппозных вакцин (сезон 2021–2022 гг.). Для обеспечения эффективного противовирусного иммунитета кДНК копии четвертого и шестого сегментов генома рекомбинантного штамма могут быть актуализированы в соответствии с циркулирующими/возникшими вариантами вируса гриппа А в системе для обратной генетики [1].

Для экспрессии рецептор-связывающего домена RBD SARS-CoV-2 использована кДНК копия восьмого сегмента вируса гриппа А. В естественных условиях несплайсированный транскрипт восьмого сегмента представляет собой мРНК, кодирующую неструктурный белок-1 (NS1). В альтернативном варианте пре-мРНК восьмого сегмента может подвергаться сплайсингу, что обеспечивает трансляцию неструктурного ядерного экспортного белка (NEP/NS2). Методами направленного мутагенеза и бесшовного клонирования в кДНК копии восьмо-

го сегмента вируса гриппа А элиминированы все альтернативные сайты сплайсинга с формированием единой гибридной рамки считывания NS1-NS2. Встраивание нуклеотидной последовательности, кодирующей рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2, фланкированный саморасщепляющимися пептидами P2A и E2A, производили между последовательностями, кодирующими NS1 и NS2. Для секретиции RBD, приближенного к нативной гомотримерной структуре, в С-концевую часть коронавируса антигена добавлен тримеризующий домен фибритина бактериофага T4. Важно отметить, что индел-мутации в трансгене RBD будут приводить к сдвигу рамки считывания, что будет приводить к тому, что синтез функционального белка NS2 будет невозможен; это приведет к элиминации мутантного вируса из квазипопуляции.

Рекомбинантный штамм-реассортант вируса гриппа А, кодирующий модифицированный фрагмент RBD гликопротеина Spike коронавируса SARS-CoV-2, получен с использованием методов обратной генетики в перемываемой перmissive культуре клеток MDCK. Изучены молекулярно-биологические, культуральные и антигенные свойства полученного рекомбинантного штамма-реассортанта вируса гриппа А. Показано, что в культуре клеток MDCK в присутствии ТРСК-трипсина (1 мкг/мл) рекомбинантный вирус гриппа А репродуцируется до 6,0–6,5 Ig ТЦД₅₀/мл. Синтез в клетках коронавируса антигена при репродукции рекомбинантного вируса гриппа А подтвержден методами иммуноцитохимии и реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к RBD Delta (AtaGenix Laboratories, КНР).

Таким образом, полученный рекомбинантный холодадаптированный штамм-реассортант вируса гриппа А, обеспечивающий экспрессию тримеризованного рецептор-связывающего домена RBD SARS-CoV-2, может быть использован в качестве компонента кандидатных мультивалентных вакцин.

Литература

1. Chauhan R. P., Gordon M. L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates // *Virus Genes*. 2022. Т. 58. №. 4. С. 255–269.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-245

**УСЛОВИЯ ПАССИРОВАНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК РЫБ ЕРС
ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ БЕЗ КРИОКОНСЕРВАЦИИ****CONDITIONS FOR PASSAGING AND MAINTAINING A CONTINUOUS EPC FISH CELL LINE
FOR A LONG TIME WITHOUT CRYOPRESERVATION**

Н. В. Дыкина, С. Л. Рудакова

*Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии, Москва*

N. V. Dykina, S. L. Rudakova

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow

✉ dyki@vniro.ru

Аннотация

Один из распространенных способов долгосрочного поддержания клеточных линий — криоконсервация. Однако данный способ далеко не всегда применим. Возможно ли сохранить клеточную линию рыб *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) длительное время без замораживания? Об этом и пойдет речь в настоящей работе.

Abstract

One of the common ways of long-term maintenance of cell lines is cryopreservation. However, this method is far from always applicable. Is it possible to preserve the fish cell line *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) for a long time without freezing? This will be discussed in the current work.

Аквакультура на сегодняшний день является одним из самых стремительно развивающихся секторов производства продуктов питания. Между тем распространение вирусных заболеваний рыб ставит под угрозу ее развитие, так как против вирусных болезней нет адекватной терапии. Поэтому своевременное выявление вирусов и превентивные меры являются ключевыми для сохранения здоровья рыб.

Определить наличие вируса в популяции рыб можно с помощью его выделения и идентификации в культуре клеток. Огромный вклад в вирусологию рыб внесли перевиваемые клеточные линии — культуры клеток, способные к неограниченному числу делений. Несмотря на эту способность, клеточные линии являются весьма уязвимыми и чувствительными к малейшим изменениям внешних условий. Для долгосрочного хранения культур клеток применяют криоконсервацию. Однако в условиях разнообразной и непрерывной работы с клеточными линиями криоконсервация нецелесообразна. Так возникает необходимость в сохранении клеточных культур без замораживания, это становится возможным при соблюдении оптимальных для клеточной линии условий. Важно определить оптимальные для отдельной клеточной линии условия поддержания, таким образом появится возможность более точно рассчитывать расход реактивов, что сделает исследования менее затратными и облегчит планирование дальнейших работ.

В настоящей работе исследована перевиваемая клеточная линия EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) — эпидермальные новообразования больного оспой карпа. Данная линия широко применяется в вирусологических исследованиях, так как чувствительна к широкому спектру вирусов, вызывающих тяжелые заболевания, в том числе у объектов отечественной аквакультуры. Несмотря на разнообразие видов рыб и активное развитие аквакультуры в России, вирусологическими исследованиями рыб занимаются лишь несколько лабораторий в НИИ Департамента ветеринарии и Росрыболовства. Кроме того, проведение филогенетического анализа вирусов невозможно без их выделения на перевиваемой линии клеток. Таким образом, проблема культивирования клеток рыб остается актуальной. Общие условия культивирования клеток рыб подробно описаны в зарубежной литературе 70–90-х гг. прошлого века, однако информации по поддержанию клеточных культур без криоконсервации практически нет. Поэтому цель настоящего исследования — определение оптимальной периодичности пассирования и замены питательной среды, а также оценка влияния данных параметров на чувствительность перевиваемых линий клеток EPC к вирусным патогенам.

Были представлены две экспериментальные группы. У одной группы была произведена еженедельная замена питательной среды в течение месяца, у второй — питательную среду не заменяли. Культуры клеток инкуби-

ровали при 15 °С. Чувствительность клеточной линии к вирусам определяли путем титрования изолятов вируса геморрагической септицемии (VHSV) и вируса весенней виремии карпа (SVCV) на культуре клеток.

Были получены следующие результаты. Группа клеток с регулярной заменой среды сохранила свои свойства до конца эксперимента. Группа клеток без замены среды демонстрировала значительное ухудшение качества, а затем наступила гибель клеток. Важно отметить, что обе группы клеток с заменой среды и без нее имели одинаковый «возраст» (количество пассажей на начало эксперимента).

По данным ряда авторов, клеточные линии рыб могут сохраняться в течение месяца без пассирования, а линия клеток ЕРС, в частности, может нормально существовать без периодической замены среды в течение месяца при 15 °С [1, 2]. Однако описанное выше справедливо при относительно невысокой плотности посева — 1:8–1:10 [2]. В настоящей работе плотность посева была в 2 раза больше, как и потребность клеток в питательных веществах.

Таким образом, периодическая замена среды является важнейшим фактором сохранения качества перевиваемой клеточной линии ЕРС. Как показывает настоящее исследование, если без пассирования клетки способны нормально существовать до 60 дней, то без внесения свежей среды они сохраняют свои свойства лишь до 30 дней.

Литература

1. Nicholson B. L. Fish Cell Culture: An Update // *Advances in Cell Culture*. 1989. V. 7. P. 1–18.
2. Fijan N., Sulimanovi Ä. D.; Bearzotti, M. et al. (1983). Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp cyprinus carpio // *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*. 1983. V. 134(2). P. 207–220.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-246

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК
ВО ВРЕМЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ**

**FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE STATE OF LYMPHOID CELLS
DURING HIV INFECTION *IN VITRO* USING FLOW CYTOMETRY WITH VISUALIZATION**

К. А. Елфимов^{1,2}, М. П. Гашникова¹, Л. Г. Готфрид¹, Н. М. Гашникова¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
²Новосибирский государственный университет

K.A. Elfimov^{1,2}, M.P. Gashnikova¹, L.G. Gotfrid¹, N.M. Gashnikova¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo
²Novosibirsk State University

✉elfimovkiril@yandex.ru

Аннотация

T-лимфоциты являются важным объектом в исследовании ВИЧ-инфекции. Существует множество методов оценки их функционального состояния, однако морфологическую оценку обычно обходят стороной или проводят визуальное исследование. В данной работе исследован ряд точных параметров в качестве маркеров морфологического и функционального состояния T-лимфоцитов с целью изучения цитопатического действия ВИЧ на лимфоидные клетки человека.

Abstract

T-lymphocytes are an important object in the study of HIV infection. There are many methods for assessing their functional state, but morphological assessment is usually bypassed or a visual examination is carried out. In this work, a number of precise parameters were studied as markers of the morphological and functional state of T-lymphocytes in order to study the cytopathic effect of HIV on human lymphoid cells.

Введение

T-лимфоциты являются главной мишенью ВИЧ во время его репликации *in vivo*. Для их исследования применяется множество тестов с целью оценки функционального состояния клеток (МТТ и др.). Самый простой способ оценки цитопатического действия ВИЧ на клеточную культуру — наблюдение за морфологией клеток методом микроскопии. Однако этот метод требует больших затрат времени и не является достаточно точным.

Целью работы была оценка возможностей быстрого и точного анализа ряда морфологических характеристик клеток лимфоидной культуры с помощью метода анализа больших клеточных популяций — проточной цитометрии с визуализацией.

Для решения поставленной цели была сформулирована **задача** — осуществить заражение клеток иммортализованной лимфоидной культуры МТ-4 разными штаммами ВИЧ-1 и измерить ряд морфологических характеристик инфицированных клеток в динамике развития инфекционного процесса.

Материалы и методы

Клеточная культура

В исследовании использовалась иммортализованная клеточная культура лимфоидного происхождения МТ-4.

Штаммы ВИЧ-1

Для моделирования ВИЧ-инфекции использовались инфекционные штаммы ВИЧ-1: МТЗп (субтип А6), МТВs (CRF63_02А6), ГКВ-4046 (субтип В).

Результаты и их обсуждение

Согласно результатам анализа, все морфологические критерии, кроме деформации цитоплазматической мембраны, имели статистически значимые различия между показателями инфицированных и здоровых клеток ($p < 0,01$).

^{*} Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

Процент популяции клеток, находящихся в клапках (агрегатах клеток), увеличивался с течением времени у инфицированных образцов и, как правило, достигал максимума к 5 суткам культивирования (рис. 1): от 7,7 % в 1 сутки после начала ВИЧ-инфекции до 18 % у MTZn, 6,7–19,0 % у MTVs, 7,6–21,0 % у Bru, 7,8–12 %

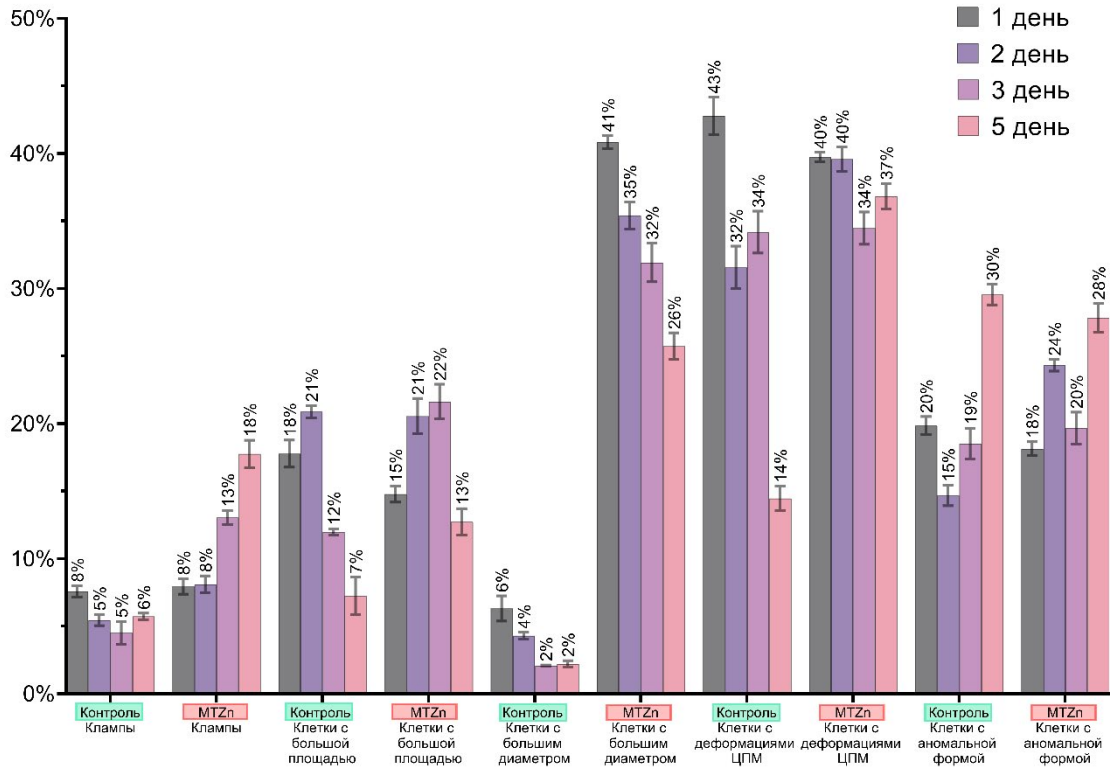


Рис. 1. Динамика изменения количества клеток с морфологическими изменениями во время ВИЧ-инфекции, вызванной штаммом MTZn ВИЧ-1

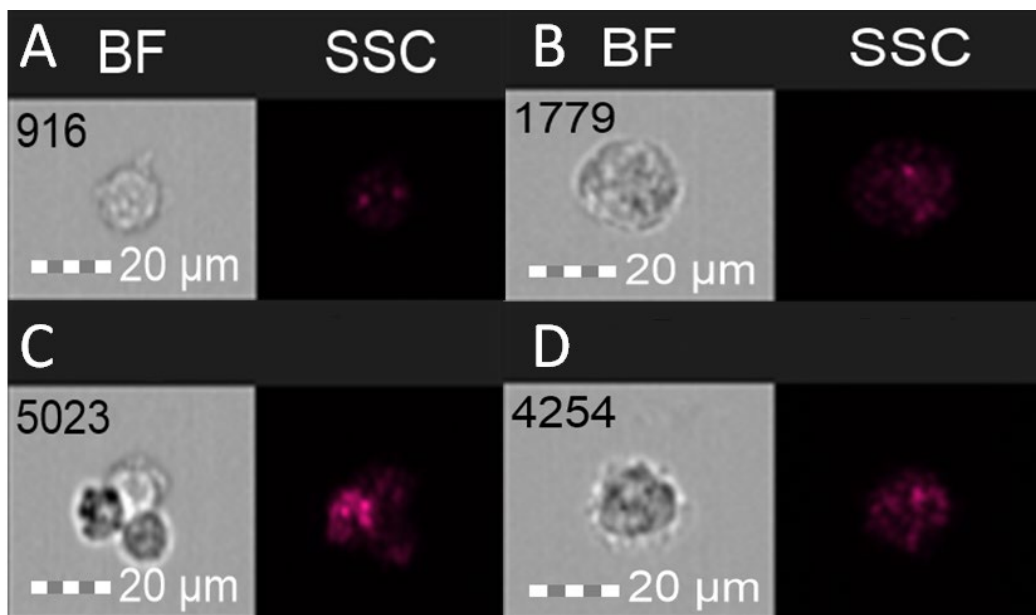


Рис. 2. Микрофотографии клеток с различной морфологией в культуре, инфицированной ВИЧ-1: А — клетка с нормальной морфологией; В — клетка с аномально увеличенной площадью и диаметром; С — кламп (агрегат клеток); D — деформированная (некруглая) клетка. Метод проточной цитометрии с визуализацией, увеличение 20х

у ГКВ-4046, контроль 7,8–5,6 %. Прослеживается динамика увеличения количества агрегатов клеток в культуре с течением ВИЧ-инфекции, что может объясняться ростом числа синцитиев и слипшихся клеток.

Количество клеток с большой площадью и диаметром так же увеличивалось в инфицированных образцах. Количество таких клеток росло с 1 суток и достигало максимума на 3 сутки культивирования. Динамика увеличения числа клеток с большой площадью с 1 до 3 суток составляла: для MTZn 14,8–22,0 %; MTBs 14,5–19,7 %; Brg 14,4–24,7 %; ГКВ-4046 16,4–19,8 %; контроль 17,9–12,0 % (уменьшение с течением времени). Увеличение доли клеток с большим диаметром наблюдалось в этом же временном диапазоне, поэтому эти данные не будут приведены.

Часть клеток, имеющих некруглую форму, увеличивалась с течением времени. Это объясняется ростом числа инфицированных клеток, которые претерпевают функциональные нарушения ввиду развивающейся ВИЧ-инфекции и теряют свою форму. При этом количество таких клеток (рис. 2) в разные дни культивирования может косвенно свидетельствовать о числе ранее инфицированных клеток, т. е. указать на прошедший пик ВИЧ-инфекции в культуре: MTZn 8,8–28 % (5 сутки); MTBs 19,1–61,3 % (5 сутки); Brg 13,5–41,2 % (5 сутки); ГКВ-4046 18,8–27 % (3 сутки); контроль 18,1–14,6 % (5 сутки).

Анализ совокупности параметров указывает на то, что число аномальных клеток увеличивается с течением времени в инфицированных образцах, а в контрольных, наоборот, снижается. При этом все использованные критерии отбора аномальных клеток согласуются между собой и позволяют оценить цитопатическое действие ВИЧ и косвенно определить функциональное состояние клеток, так как морфологические изменения являются отражением процессов в клетке. В будущем подобный набор тестов можно использовать для первичного скрининга перспективных лекарственных препаратов.

Выводы

1. Определен набор морфологических параметров, которые могут использоваться для оценки цитопатического действия ВИЧ *in vitro*: количество клампов, аномально большая площадь и диаметр, отклонение формы клетки от нормальной;

2. Показано, что проточная цитометрия с визуализацией является перспективным инструментом для исследования состояния лимфоидных клеток во время ВИЧ-инфекции благодаря высокой точности и простоты анализа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-247

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОМ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ЗАРАЖЕННЫМИ И НЕ ЗАРАЖЕННЫМИ ВИРУСОМ ГРИППА КЛЕТКАМИ, НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА***THE INFLUENCE OF EXOSOMES SECRETED BY BOTH INFLUENZA VIRUS-INFECTED AND NON-INFECTED CELLS ON VIRUS REPLICATION**Я. А. Забродская^{1,2}, Н. В. Гаврилова^{1,2}, М. А. Плотникова¹, А. А. Ложков^{1,2}¹*НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург*²*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*Y. A. Zabrodskaya^{1,2}, N. V. GavriloVA^{1,2}, M. A. Plotnikova¹, A. A. Lozhkov^{1,2}¹*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg*²*Peter the Great Saint Petersburg Polytechnical University*

✉ yana@zabrodskaya.net

Аннотация

Были выделены экзосомы, секретируемые зараженными (EV) и не зараженными (E) вирусом гриппа клетками и показано, что EV способны подавлять иммунный ответ клеток. При заражении клеток в присутствии E или EV было показано, что E обладают протективным эффектом, снижая репликацию вируса, а EV, наоборот, обладают провирусным действием.

Abstract

Exosomes secreted by both influenza virus infected (EV) and non-infected (E) cells were isolated. It was demonstrated that EVs could suppress the immune response of cells. When cells were infected with the influenza virus in the presence of either E or EV, it was observed that E had a protective effect, reducing virus replication. Conversely, EV had a proviral effect, meaning it enhanced virus replication.

В настоящее время широко исследуются внеклеточные мембранные везикулы, секретируемые клетками как животных, так и растений. Особое внимание уделяется экзосомам, выполняющим функции межклеточной коммуникации. Подобные везикулы изучаются, с одной стороны, с фундаментальной точки зрения — для понимания механизмов жизнедеятельности клеток в норме и при различных патологических процессах (в том числе при вирусных инфекциях) [1], а с другой стороны, с практической точки зрения — для использования внеклеточных везикул как средств доставки терапевтических молекул [2]. В ряде исследований показана роль экзосом в жизненном цикле вирусов, например вируса простого герпеса, вируса иммунодефицита человека, вируса Эпштейна — Барр и вирусов гепатита А и С. Так, показано, что экзосомы помогают вирусам уклоняться от иммунного ответа и способствуют распространению вируса в организме.

Целью нашей работы было выявить роль экзосом в патогенезе гриппа на модели клеточных культур. Для этого необходимо было получить чистые образцы экзосом, секретируемых зараженными (EV) и не зараженными (E) вирусом гриппа клетками, после чего стимулировать ими интактные клетки и оценить изменение экспрессии ряда генов, связанных с иммунным ответом клеток, а затем оценить влияние экзосом на заражение клеток вирусом гриппа.

Критическим этапом является получение образцов экзосом, свободных от вирусных частиц. Поскольку экзосомы и вирус гриппа обладают сходными физико-химическими характеристиками, то разделение экзосом и вирусов является нетривиальной задачей. Ранее нами был разработан ряд методов выделения экзосом из зараженных вирусом гриппа клеток, в частности с использованием гидрофобной хроматографии [3]. Однако наиболее эффективным и воспроизводимым методом, который и был использован в дальнейшей работе, оказалось ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы, при котором частицы разделяются в соответствии с незначительными различиями их плавающей плотности [4].

На первом этапе работы было изучено влияние экзосом на экспрессию генов, связанных с иммунным ответом клеток [5]. Интактные клетки A549 стимулировали E или EV в течение 24 часов, после чего выделяли РНК из клеток, и методом ОТ-ПЦР в реальном времени оценивали изменение экспрессии следующих генов: *RIG1*, *IFIT1*, *MDA5*, *MxA*, *PKR*, *SOCS1*, *COX2*, *AnxA1*, *NFκB*, *IL6*, и *IL18*. Для всех исследуемых генов, кроме *MxA*

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-15-00228.

и *SOCS1*, было показано достоверное снижение экспрессии для EV относительно контроля, при этом достоверное снижение для EV относительно E было показано для *RIG1*, *IFIT1*, *MDA5*, *COX2*, *AhxA1* и *IL18*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что введение EV специфически подавляло систему распознавания экзогенных вирусных РНК с одновременным подавлением проапоптотического сигнального каскада.

Далее было изучено влияние E и EV на репликацию вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) при заражении клеток MDCK [5]. Изменение репликации в супернатантах оценивали методом ПЦР на М-сегмент, а в клетках — с помощью ELISA In-cell с антителами к нуклеопротеину. В качестве контроля использовали зараженные клетки без добавления экзосом. При использовании двух доз заражения (5 и 0.5 TCID₅₀ на лунку), а также одно- и многоциклового инфицирования мы наблюдали разнонаправленный эффект экзосом на репликацию вируса: с одной стороны, E снижали репликацию вируса (относительно контрольных клеток и EV), а с другой стороны, EV повышали репликацию вируса (относительно E и контроля).

В результате работы было показано, что экзосомы, секретируемые зараженными и не зараженными вирусом гриппа А клетками, способны участвовать в регуляции иммунного ответа клеток. При этом полученные данные указывают на то, что E обладают протективным эффектом, в то время как EV способны подавлять иммунный ответ клеток.

Литература

1. Purvinsh L. et al. Extracellular Vesicles in Viral Pathogenesis: A Case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde // *Life*. 2021. V. 11. P. 45.
2. Gorshkov A. et al. Exosomes as Natural Nanocarriers for RNA-Based Therapy and Prophylaxis // *Nanomaterials*. 2022. V. 12. P. 524.
3. Забродская Я. А. и др. Способ хроматографической очистки экзосом и их разделения от вирионов вируса гриппа А на основе гидрофобного взаимодействия с сорбентом // Патент на изобретение. 2023. Заявка № 2022131900/10(069601) от 07.12.2022.
4. Гаврилова Н. В. и др. Методы разделения экзосом и вируса гриппа А. // *LifeSciencePolytech*. Тезисы докладов Всероссийской научной очно-заочной конференции. Санкт-Петербург. 2023. С. 103.
5. Zabrodskaya Y. et al. Exosomes Released by Influenza-Virus-Infected Cells Carry Factors Capable of Suppressing Immune Defense Genes in Naïve Cells // *Viruses*. 2022. V. 14. P. 2690.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-248

ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ВИРУСА СЕНДАЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИНТРАНАЗАЛЬНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ COVID-19 ***VECTOR SYSTEM BASED ON THE SENDAI VIRUS FOR THE DEVELOPMENT OF INTRANASAL VACCINES AGAINST RESPIRATORY INFECTIONS USING THE EXAMPLE OF COVID-19**

С. С. Зайнутдинов, Г. А. Кудров, А. В. Шиповалов, Ю. А. Меркульева, И. С. Шульгина

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

S. S. Zainutdinov, G. A. Kudrov, A. V. Shipovalov, Yu. A. Merkuleva, I. S. Shulgina

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ zaynutdinov_ss@vector.nsc.ru

Аннотация

Сконструирована система получения рекомбинантных вариантов вируса Сендай штамма Москва, несущих трансгены протективно-значимых белков инфекционных агентов. На ее основе получен вариант Sen-RBDdelta(M), экспрессирующий секретрируемую форму рецепторсвязывающего домена S-белка SARS-CoV-2, показавший на модели мышей BALB/c иммуногенность и протективность против SARS-CoV-2 при однократном интраназальном введении.

Abstract

A system for obtaining recombinant variants of the Sendai virus of the Moscow strain carrying transgenes of protectively significant proteins of infectious agents was designed. On its basis, the Sen-RBDdelta(M) variant was obtained, expressing the secreted form of the SARS-CoV-2 S-protein receptor-binding domain, which showed immunogenicity and protection against SARS-CoV-2 in the BALB/c mouse model after a single intranasal injection.

Вирус Сендай — парамиксовирус мышей, который, не вызывая заболевания, может ограниченно реплицироваться в клетках бронхиального эпителия человека. Благодаря этому он может использоваться интраназально в качестве живой векторной вакцины для профилактики респираторных инфекций, включая COVID-19.

В качестве основы для создания системы получения рекомбинантов вируса Сендай использована последовательность штамма Москва (GenBank: KP717417.1). Система включает три вспомогательные плазмиды, экспрессирующие вирусные гены N, P и L под контролем промотора РНК-полимеразы фага T7, и одну плазмиду с полноразмерной ДНК-копией его геномной РНК (pSen2), точность размера которой контролируется двумя ограничивающими ее рибозимами. В плазмиду pSen2 между вирусными генами P и M был введен структурный элемент, позволяющий встраивать и экспрессировать трансгены. Он содержит полилинкер из пяти уникальных сайтов крупнощепящих рестриктаз BsiW I, Nru I, Cla I, Asc I, BssH II, за которым следуют сигнал терминации транскрипции трансгена и сигнал реинициации транскрипции последующего гена (M) для РНК-полимеразы вируса Сендай.

В качестве трансгенов были использованы ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и ген рецепторсвязывающего домена (RBD) S-белка штамма дельта-вируса SARS-CoV-2, имеющий сигнал секреции на N-конце; соответствующие плазмиды назвали pSen2-EGFP(M) и pSen2-RBDdelta(M). Получение (оживление) рекомбинантных вариантов вируса Сендай штамма Москва проводили в трансформированных клетках 293T7, продуцирующих РНК-полимеразу фага T7. Трансфекция клеток четырьмя плазмидами (три вспомогательные и соответствующая геномная) в обоих случаях приводила к образованию вируса и характерному цитопатическому эффекту. В случае плазмиды pSen2-EGFP(M) можно было также наблюдать флуоресценцию трансфицированных клеток. Полученные рекомбинантные штаммы, Sen-EGFP(M) и Sen-RBDdelta(M), были использованы в дальнейшем эксперименте по оценке иммуногенности и протективности при интраназальной вакцинации против вируса SARS-CoV-2 на модели мышей линии BALB/c.

В эксперименте участвовало 3 группы мышей. Мышей опытной группы иммунизировали вирусом Sen-RBDdelta(M), мышей первой контрольной группы — вирусом Sen-EGFP(M) (контроль вектора), мышам второй контрольной группы вводили фосфатно-солевой буфер. Доза вирусов, использованная при интраназальном введении мышам первых двух групп, составляла 10^5 БОЕ/мышь. При такой дозе видимых признаков заболевания

* Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ГЗ-37/21.
© С. С. Зайнутдинов, Г. А. Кудров, А. В. Шиповалов, Ю. А. Меркульева, И. С. Шульгина, 2023

от инфекции вирусом Сендай не наблюдалось. Через 28 дней специфические к коронавирусу антитела класса G, в том числе вируснейтрализующие, были выявлены у всех мышей опытной группы, но не обеих контрольных групп. Последующее интраназальное заражение мышей гамма-штаммом SARS-CoV-2 в дозе 50 ИД₅₀/мышь показало, что в тканях полости носа и легких опытной группы мышей происходит статистически значимое по сравнению с контролем (буфер) снижение количества РНК коронавируса на 3 и 2 порядка соответственно. Группа контроля вектора, иммунизированная рекомбинантом Sen2-EGFP(M), имела больший уровень вирусной нагрузки по сравнению с группой Sen-RBDdelta(M) и меньший в сравнении с интактным контролем без статистически значимых различий между группами.

Литература

1. Набор рекомбинантных плазмидных ДНК для получения рекомбинантных вирусов Сендай штамма Москва (варианты): патент РФ № 2787724. 2023 / Зайнутдинов С. С., Кочнева Г. В., Сиволобова Г. Ф., Гражданцева А. А. – заявл. 09.12.2021; опубл. 12.01.2023. Бюл. № 2. 57 с.
2. Кудров Г. А., Зайнутдинов С. С., Гражданцева А. А., Шиповалов А. В., Сиволобова Г. Ф., Семенова А. В., Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н., Таранов О. С., Зайковская А. В., Шульгина И. С., Пьянков О. В., Кочнева Г. В. Интраназальная вакцина против COVID-19 на основе рекомбинантного варианта вируса Сендай (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) штамма Москва // Вопросы вирусологии. 2023. Т. 68. № 3. С. 42–54.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-249

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ КЛАССА М У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19
К РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕМУ ДОМЕНУ ШИПОВИДНОГО БЕЛКА SARS-COV-2****A STUDY OF CLASS M ANTIBODY TITER IN RECOVERED COVID-19 PATIENTS
TO THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE SARS-COV-2 SPIKE PROTEIN**Е. О. Зяблицкая¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}, С. А. Ельчанинова³, Е. А. Колосова^{1,2}¹Алтайский государственный университет, Барнаул²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово³Алтайский государственный медицинский университет, БарнаулE. O. Zyabliczkaya¹, D. N. Shcherbakov^{1,2}, S. A. Elchaninova³, E. A. Kolosova^{1,2}¹Altai State University, Barnaul²State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo³Altai State Medical University, Barnaul

✉ greenice000@mail.ru

Аннотация

Несмотря на отмену статуса пандемии COVID-19, все еще актуальным остается вопрос о динамике антител, специфических к новому коронавирусу. Целью настоящей работы является оценка уровня антител класса М к рецепторсвязывающему домену шиповидного белка SARS-CoV-2 у переболевших COVID-19 и поиск его взаимосвязей с такими показателями и характеристиками, как коэффициент позитивности, степень тяжести, возраст, пол и длительность периода после болезни.

Abstract

Despite the cancellation of the COVID-19 pandemic status, the question of the dynamics of specific antibodies to the new coronavirus is still relevant. The aim of this study is to assess the level of class M antibodies to the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein in recovered COVID-19 patients and to search for its relationship with such indicators and characteristics as the positivity coefficient, sex, age, severity and duration of the period after the disease.

Коронавирусная инфекция (COVID-19) — природно-очаговое острое вирусное заболевание с преимущественным поражением верхних дыхательных путей, вызываемое РНК-содержащим вирусом SARS-CoV-2 [1]. Строение вириона определяется четырьмя структурными белками, из которых два — рецепторсвязывающий домен спайкового белка (RBD) и нуклеопротеин (N), представляют наибольший интерес в плане иммунохимических исследований, поскольку обладают наибольшей антигенной активностью.

Специфические к вирусу иммуноглобулины класса М являются маркером недавней или текущей инфекции и обнаруживаются в крови в интервале от 1 до 14 дней после проявления симптомов болезни, достигая пика на 10–16-й день [2, 3].

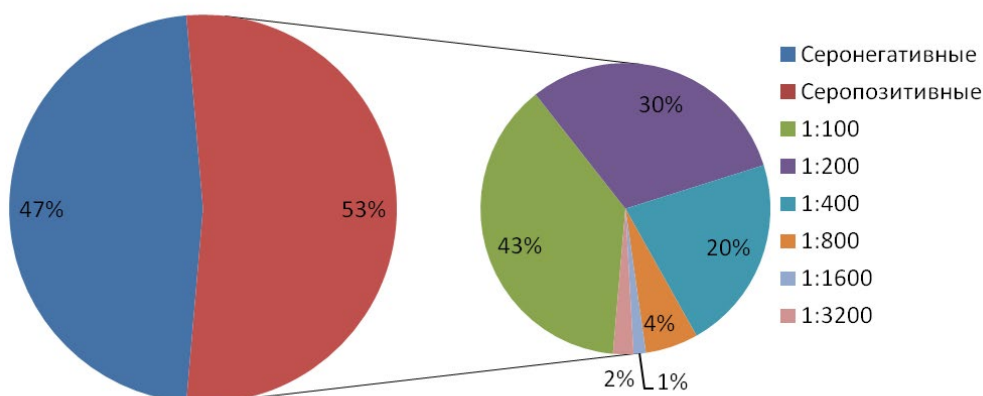
В исследовании использовались сыворотки крови 419 жителей Алтайского края, переболевших COVID-19 в период с января 2020 г. по май 2021 г. Сбор венозной крови у пациентов проводился с 11 февраля по 17 сентября 2021 г. в четырех повторностях. Среди пациентов насчитывалось 94 мужчины и 308 женщин в возрасте от 20 до 85 лет. Индикатором тяжелого течения болезни послужило наличие сопутствующей пневмонии, которая была подтверждена у 26,5 % (111 человек) обследованных. Период от начала проявления симптомов COVID-19 до анализа на антитела IgM в среднем составил 228 дней.

С учетом четырех сборов крови общая выборка составила 620 сывороток и была использована для исследования связи титра антител класса М с продолжительностью периода после болезни. Для сохранения независимости наблюдений анализ связей с другими факторами, а также с коэффициентом позитивности проводился на подвыборке из 419 сывороток, которые соответствуют только первому сбору крови.

Измерение титра специфических к SARS-CoV-2 антител класса М проводилось методом твердофазного иммуоферментного анализа, согласно методике [4]. В качестве сорбированного антигена был использован рекомбинантный рецепторсвязывающий домен (RBD) шиповидного белка вируса SARS-CoV-2, полученный на основе RBD уханьского штамма Wuhan-Hu-1. Подбор оптимальных условий эксперимента включил в себя исследование неспецифического связывания антител с белком RBD и установление рабочего разведения конъюгата.

В определении коэффициента неспецифического связывания использовалось 55 сывороток, собранных до начала пандемии. Коэффициент рассчитывался как средняя оптическая плотность всех сывороток на планшете. Его значение по результатам исследования составило 0,242, что свидетельствует об интенсивном неспецифическом связывании.

Согласно результатам исследования, из 419 анализируемых сывороток 221 (53 %) оказалась серопозитивной. Из них 93 % составили сыворотки с титрами антител 1:100, 1:200 и 1:400. Высокий титр антител IgM — 1:800 и более, был обнаружен лишь у 7 % (см. рисунок). Тем самым можно заключить, что специфические к RBD антитела класса М могут сохраняться в крови более года с начала болезни, но в малых концентрациях.



Распределение титра антител класса М против белка RBD у переболевших COVID-19

Коэффициент позитивности рассчитывался как отношение оптической плотности исследуемой сыворотки к пороговому значению. Между титром антител класса М и коэффициентом позитивности была обнаружена сильная прямая связь ($r_{(s)} = 0,9$, $p < 0,001$), что доказывает возможность его использования для интерпретации серодиагностических тестов на антитела к SARS-CoV-2.

Для анализа влияния на уровень антител степени тяжести выборка была разбита на две группы по признаку наличия/отсутствия пневмонии. Между группами были обнаружены статистически значимые различия ($df = 6$, $\chi^2 = 19,5$, $p = 0,003$): в группе пациентов с пневмонией был увеличен общий процент сывороток с высоким титром антител (9 % против 4 % во второй группе). Таким образом, сопутствующая пневмония способствует повышению уровня антител класса М к RBD.

Для анализа связи титра с возрастом выборка была сгруппирована по трем возрастным периодам — от 20 до 40 лет, от 41 до 60 лет, от 61 до 85 лет. Между группами были обнаружены статистически значимые различия ($H = 12,2$, $p = 0,002$). Наблюдалось уменьшение процента сывороток с высоким титром от первой (6 %) ко второй возрастной группе (4 %) при полном отсутствии таковых в третьей возрастной группе. Процент серонегативности, наоборот, увеличивается от первой (42 %) к третьей группе (62 %). Таким образом, титр антител класса М к RBD имеет тенденцию к снижению с возрастом.

Взаимосвязь титра антител класса М против RBD с полом ($df = 6$, $\chi^2 = 4,13$, $p = 0,66$) и длительностью периода после болезни ($H = 0,826$, $p = 0,662$) не была обнаружена.

Таким образом, проведенное нами исследование вносит существенный вклад в выяснение общих закономерностей и особенностей динамики специфических антител к новому коронавирусу SARS-CoV-2.

Литература

1. Никифоров В. В., Суранова Т. Г., Чернобровкина Т. Я. и др. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты // Архив внутренней медицины. 2020. № 2. С. 87–93.
2. Long Q. X., Liu B. Z., Deng H. J. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 // Nature medicine. 2020. Vol. 26. P. 845–848.
3. Zheng J., Deng Y., Zhao Z. et al. Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects // Cellular & Molecular Immunology. 2022. P. 150–157.
4. Колосова Е. А., Шапорова О. Н., Никулина Ю. А. и др. Антитела к рецепторсвязывающему домену спайкового белка SARS-CoV-2: связь с возрастом, пневмонией, длительностью периода после COVID-19 // Журнал инфектологии. 2022. Т. 14 (1). С. 69–77.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-250

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС, ЭКСПОНИРУЮЩИЙ GP38
ВИРУСА КРЫМ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ****RECOMBINANT VIRUS EXHIBITING GP38 OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS**Д. И. Ивкина¹, А. Р. Иматдинов¹, Э. В. Дубровская^{1,2}, И. Р. Иматдинов¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
²Новосибирский государственный университетD. I. Ivkina¹, A. R. Imatdinov¹, E. V. Dubrovskaya^{1,2}, I. R. Imatdinov¹¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo
²Novosibirsk State University

✉ daryaivkina1@gmail.com

Аннотация

Крым-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ) — широко распространенное арбовирусное заболевание с летальностью у людей до 40 %. Несмотря на тяжесть заболевания и географическое распространение ККГЛ, в настоящее время не зарегистрировано вакцинных и терапевтических препаратов. В работе приведены данные о рекомбинантном рабдовирусе, экспрессирующем модифицированный гликопротеин GPC вируса ККГЛ эпидемиологически актуального для РФ изолята.

Abstract

Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a widespread arbovirus disease with a mortality rate of up to 40 % in humans. Despite the severity of the disease and the geographic distribution of CCHF, no vaccine or therapeutic agents are currently registered. The paper presents data on a recombinant rhabdovirus expressing a modified glycoprotein GPC of the CCHF virus, an isolate epidemiologically relevant for the Russian Federation.

Вирус ККГЛ распространен на территориях стран Восточного полушария, расположенных к югу от 50-й параллели северной широты, что напрямую связано с ареалом распространения основного переносчика — клещей рода *Hyalomma*. Резервуарами вируса выступают инфицированные грызуны, птицы, широкий спектр домашних и диких животных, но только у людей развивается симптоматическое заболевание ККГЛ, проявляющееся гриппоподобными симптомами, переходящими в геморрагическую стадию с полиорганной недостаточностью и смертностью, достигающей 40 % [1]. В настоящее время не зарегистрировано эффективных профилактических препаратов и средств специфической терапии, в связи с чем Всемирная организация здравоохранения включила ККГЛ в перечень десяти заболеваний, для которых требуется приоритетная разработка вакцинных и терапевтических препаратов [2].

Вирус ККГЛ имеет 3-сегментный РНК-геном (сегменты S, M, L) отрицательной полярности, M-сегмент кодирует белок-предшественник GPC, который в результате протеолитического расщепления формирует структурные белки Gn и Gc, опосредующие прикрепление и проникновение вируса в клетки, и неструктурные белки NSm, GP38 и MLD, участвующие в процессинге и транспортировке структурных гликопротеинов. В недавних исследованиях идентифицированы вирусные антигены, при формировании иммунного ответа на которые показан протективный иммунитет от летальной инфекции ККГЛ. Так, использование полноразмерного GPC в качестве основного антигена обеспечило 100 % защиту мышей (STAT-1^{-/-}) при контрольном заражении ККГЛ, в то время как только структурные гликопротеины Gn и Gc в экспериментальных вакцинах приводили к индукции вируснейтрализующих антител, но не обеспечивали полноценную защиту от гибели. Данные согласуются с результатами исследований 2023 г., в которых показано, что достаточным для формирования протективного иммунитета против ККГЛ является неструктурный гликопротеин GP38 [3, 4].

В ФБУН ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора ведутся исследования по разработке кандидатной вакцины против ККГЛ с использованием нескольких технологических платформ. Методами обратной генетики получен генетически аттенуированный рабдовирус, экспрессирующий модифицированный гликопротеин GPC вируса ККГЛ эпидемиологически актуального для РФ изолята. Модификация гликопротеина GPC направлена на экспонирование антигенов как на поверхности вирионов, так и на поверхности инфицированных клеток. Ключевым решением, направленным на эффективную презентацию компонента GP38, являлось нарушение сайта протео-

литического расщепления SKI-1/S1P и С-концевого домена гликопротеина Gc, что приводит к ассоциации GP38 со структурным гликопротеином Gn. Клонирование открытой рамки считывания GPC (4896 п. н.) проведено в векторе для обратной генетики nStem_rVSV_dG по сайтам гидролиза эндонуклеаз рестрикции MluI, EagI. Корректность нуклеотидных последовательностей подтверждена методами рестрикционного анализа и секвенированием по Сэнгеру.

«Оживление» рекомбинантного вируса, экспонирующего гликопротеины GP38, Gn и Gc вируса ККГЛ, проведено с использованием методов обратной генетики. Репликационно-компетентный rVSV_CCHFVGPC репродуцируется в клетках перевиваемых линий Vero, Vero E6, ВНК-21/13, 4647 в титрах $7,5 \pm 0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Показано, что рекомбинантный вирус сохраняет культуральные и антигенные свойства при культивировании в перmissive клеточной системе не менее чем 10 пассажей. Генетическая стабильность рекомбинантного вируса rVSV_CCHFVGPC подтверждена методами фрагментарного секвенирования по Сэнгеру и NGS на платформе Illumina MiSeq. Иммуногенные свойства рекомбинантного вируса, экспонирующего гликопротеины вируса ККГЛ, изучены в ходе 2-кратной иммунизации в дозе 10^7 БОЕ с интервалом 14 дней лабораторных мышей линии BALB/c. Показано, что на 28 сутки после первой иммунизации выявлены вирусспецифические антитела в ТФ ИФА с использованием рекомбинантных гликопротеинов вируса ККГЛ.

Таким образом, полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей и позволяют рассматривать полученный репликационно-компетентный рекомбинантный вирус rVSV_CCHFVGPC, экспонирующий гликопротеины вируса ККГЛ, в качестве прототипа живой вирус-вакцины для профилактики ККГЛ.

Литература

1. Hawman D. W., Feldmann H. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus // *Nature Reviews Microbiology*. 2023. С. 1–15.
2. World Health Organization (WHO). Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts> (accessed: 31.07.2023).
3. Rodriguez S. E. et al. Vesicular stomatitis virus-based vaccine protects mice against Crimean-Congo hemorrhagic fever // *Scientific reports*. 2019. Т. 9. №. 1. С. 7755.
4. Scher G. et al. GP38 as a vaccine target for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus // *npj Vaccines*. 2023. Т. 8. №. 1. С. 73.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-251

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ МИКСОМЫ, ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА ***COMPARISON OF ONCOLYTIC EFFECT OF MYXOMA VIRUS, VESICULAR STOMATITIS VIRUS AND NEWCASTLE DISEASE VIRUS**А. С. Исаева^{1,2}, С. И. Володина¹, Н. О. Порозова¹, Э. Э. Идота¹,
Г. Бабаева^{3,4}, В. С. Покровский³⁻⁵, А. С. Малоголовкин^{1,5}¹*Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова Минздрава России*²*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*³*Российский университет дружбы народов, Москва*⁴*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва*⁵*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*A. S. Isaeva^{1,2}, S. I. Volodina¹, N. O. Porozova¹, E. E. Idota¹, G. Babaeva^{3,4}, V. S. Pokrovsky³⁻⁵, A. S. Malogolovkin^{1,5}¹*I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*²*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*³*Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow*⁴*N. N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow*⁵*Sirius University of Science and Technology, Sochi*

✉ isaeva_a_s@staff.sechenov.ru

Аннотация

По сравнению со стандартными методами лечения опухолевых заболеваний онколитические вирусы обладают рядом преимуществ: тропизм к опухолям различного происхождения, литический и иммуностимулирующий эффект. В нашем исследовании мы сравниваем онколитическое действие вирусов миксомы, везикулярного стоматита и болезни Ньюкасла на *in vitro* и *in vivo* моделях рака.

Abstract

Compared to conventional methods for tumor treatment, oncolytic viruses have a number of advantages: tropism to tumors of various origins, lytic and immunostimulating effect. In our study, we compared the oncolytic effect of myxoma viruses, vesicular stomatitis and Newcastle disease using *in vitro* and *in vivo* cancer models.

Онколитические вирусы представляют собой новый перспективный вид терапии опухолевых заболеваний. В настоящее время регулирующими органами одобрены и применяются в клинической практике препараты на основе аденовируса, вируса простого герпеса 1 типа, эховируса и вируса осповакцины [1]. Проводятся многочисленные клинические испытания (2000–2022 гг. — более 200) различных онколитиков из 9 семейств (*Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Retroviridae*, *Parvoviridae*) [2], в числе которых вирус везикулярного стоматита (ВВС) и вирус болезни Ньюкасла (ВБН). В отличие от ВВС и ВБН вирус миксомы (ВМ) менее изучен и не достиг еще стадии клинических испытаний, но также демонстрирует онколитический эффект на *in vitro* и *in vivo* моделях [3].

ДНК-вирус миксомы относится к семейству *Poxviridae*, в природе инфицирует кроликов и приводит к летальной болезни — миксоматозу. В отличие от многих других онколитических вирусов ВМ при проникновении в клетку не связывается с поверхностными рецепторами и, как следствие, обладает широким тропизмом [4]. Большой геном вируса (161,8 кб) позволяет использовать его в качестве вектора для доставки терапевтических молекул и модификации для потенцирования онколитических свойств ВМ [5].

РНК-вирус болезни Ньюкасла принадлежит семейству *Paramyxoviridae*. Подобно ВМ, ВБН является оболочечным вирусом и способен проникать в широкий спектр клеток [6]. Благодаря модульной системе транскрипции генома и отсутствию ДНК-стадии ВБН отличается быстрым репликационным циклом и накоплением вирус-

* Работа выполнена при поддержке Программы академического лидерства «Приоритет 2030», предложенной ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

© А. С. Исаева, С. И. Володина, Н. О. Порозова, Э. Э. Идота, Г. Бабаева, В. С. Покровский, А. С. Малоголовкин, 2023

ного потомства [7]. Природные изоляты ВБН показывали выраженный противоопухолевый эффект при терапии рака множественной этиологии [8].

Вирус везикулярного стоматита семейства *Rhabdoviridae* инфицирует различные виды хозяев: от растений до позвоночных животных. Подобно ВБН, геном ВВС представлен (-) цепью РНК и обладает быстрым инфекционным циклом в перmissive клеточных культурах. ВВС способен вызывать апоптоз раковых клеток в течение нескольких часов [9].

Целью нашей работы является сравнение онколитического действия ВМ, ВВС и ВБН на *in vitro* и *in vivo* моделях рака.

С использованием модельных клеточных культур солидных опухолей человека и мыши (B16F10, HepG2, A549, MCF7) показан цитотоксический эффект онколитических вирусов. Методом ПЦР в реальном времени была показана динамика репликации ВВС и ВМ *in vitro* при разной множественности заражения. На мышшиной модели C57BL6/B16F10 продемонстрирована задержка роста опухоли при внутритуморальном введении ВВС, ВБН, ВМ и увеличение выживаемость мышей.

В результате культура MCF7 оказалась наименее перmissive для всех изученных нами вирусов. Наибольший цитотоксический эффект для ВМ, ВВС и ВБН наблюдался на культуре клеток HepG2 и A549 соответственно. Выраженное торможение роста опухоли относительно контрольной группы мышей наблюдалось в группе животных, инфицированных ВВС (относительный средний объем опухоли на последний 21 день эксперимента составлял 72 %, 35 %, 55 % для ВМ, ВВС и ВБН соответственно).

Полученные данные помогут в выборе наиболее подходящего кандидата для последующих исследований в области онколитической виротерапии опухолевых заболеваний. Перспективные онколитики в дальнейшем могут быть дополнительно усилены для повышения эффективности иммунотерапии резистентных видов рака.

Литература

1. Shalhout S. Z., Miller D. M., Emerick K. S. *et al.* Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023. V. 20. P. 160–177.
2. Macedo N., Miller D.M., Haq R., *et al.* Clinical landscape of oncolytic virus research in 2020 // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2020. V. 8. e001486.
3. Rahman M. M., McFadden G. Oncolytic Virotherapy with Myxoma Virus // *Journal of clinical medicine*. 2020. V. 9 (1). P. 171.
4. Schmidt, F.I., Bleck, C.K., Mercer, J. Poxvirus host cell entry // *Current opinion in virology*. 2012. V. 2(1). P. 20–27.
5. Cameron C., Hota-Mitchell S., Chen L., *et al.* The complete DNA sequence of myxoma virus // *Virology*. 1999. V. 264 (2). P. 298–318.
6. Schirmacher V. Oncolytic Newcastle disease virus as a prospective anti-cancer therapy. A biologic agent with potential to break therapy resistance // *Expert opinion on biological therapy*. 2015. V. 15(12). P. 1757–1771.
7. Nagai, Y., Hamaguchi, M., Toyoda, T. Molecular biology of Newcastle disease virus // *Progress in veterinary microbiology and immunology*. 1989. V. 5. P. 16–64.
8. Malogolovkin A., Gasanov N., Egorov A., Weener M., Ivanov R., Karabelsky A. Combinatorial Approaches for Cancer Treatment Using Oncolytic Viruses: Projecting the Perspectives through Clinical Trials Outcomes // *Viruses*. 2021. V. 13(7) P. 1271.
9. Barber G. N. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector // *Viral immunology*. 2004. V. 17 (4). P. 516–527.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-252

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУЛЕНТНЫХ И АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF VIRULENT AND ATTENUATED STRAINS OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS**А. Ю. Кольцов, Н. С. Холод, С. А. Крутько, С. В. Белов,
А. В. Коротин, С. В. Рудакова, М. М. Сухер, Г. С. Кольцова*Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский*

A. Yu. Koltsov, N. S. Kholod, S. A. Krutko, S. V. Belov, A. V. Korotin, S. V. Rudakova, M. M. Sukher, G. S. Koltsova

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky

✉ kolcov.andrew@gmail.com

Аннотация

Африканская чума свиней — контагиозное вирусное заболевание свиней. Попытки аттенуации вируса АЧС путем пассирования в клеточных линиях привели к получению ослабленных штаммов, некоторые из которых обеспечивали защиту от заражения гомологичным вирусом. В данном исследовании представлены результаты анализа биологических и генетических характеристик аттенуированного штамма КК262 (Congo-a) по сравнению с исходным вирулентным штаммом К49 (Congo-v).

Abstract

African swine fever is a contagious disease of pigs caused by the ASF virus. The main problem in the field of ASF control is the lack of vaccines. Attempts to obtain vaccines by attenuating the ASFV on cultured cell lines led to the production of attenuated viruses, some of which provided protection against infection with a homologous virus. Here we report on the biological and genomic features of the attenuated Congo-a virus compared to its virulent homologue Congo-v.

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная геморрагическая лихорадка диких и домашних свиней с летальностью до 100 %, которая, возможно, является наиболее серьезной угрозой свиноводства во всем мире.

Стоит отметить, что до сих пор не зарегистрированы безопасные и эффективные вакцины для профилактики АЧС. Тем не менее продемонстрировано, что иммунизация рекомбинантными и живыми ослабленными вирусами может обеспечивать защиту от заражения гомологичным вирусом АЧС. Однако другие исследования показали, что некоторые вирусные штаммы, хотя и проявляли пониженную вирулентность, не обеспечивали защиту животных от заражения. К сожалению, информация о генетических изменениях, связанных с адаптацией вируса к клеточным линиям и аттенуацией вируса АЧС, ограничена. В данном исследовании представлены результаты анализа биологических и генетических характеристик аттенуированного штамма Congo-a (КК262) по сравнению с исходным вирулентным штаммом Congo-v (К49).

Штамм К49 представляет собой высоковирулентный штамм вируса АЧС с летальной дозой 100 ГАЕ. Штамм КК262 — авирулентный вариант, полученный путем многократного пассирования в первичной (клетки костного мозга свиней) и перевиваемой (СПЭВ) культурах клеток и адаптированный к репликации в перевиваемой линии клеток COS-1. Оба штамма принадлежат к генотипу I и серогруппе 2. Кроме того, штамм КК262 способен реплицироваться в нескольких перевиваемых клеточных линиях, таких как А4С2/9к, SK6, РТР, Vero и МА-104, тогда как родительский штамм К49 реплицируется только в первичных культурах клеток.

Репликация *in vivo* и вирулентность аттенуированного и вирулентного штаммов вируса АЧС оценивали в эксперименте с восприимчивыми животными. Свиней из группы 1 (n = 10) заражали внутримышечно штаммом КК262 (2×10⁶ ГАЕ50). Свиней группы 2 (n = 10) внутримышечно заражали штаммом К49 (10⁵ ГАЕ50). Клинические признаки и ректальную температуру тела регистрировали ежедневно на протяжении всего эксперимента.

ДНК вируса АЧС для NGS экстрагировали из первичной культуры клеток макрофагов свиней, инфицированных штаммами К49 и КК262. Геномные библиотеки готовили с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNextNEBNext® Ultra™II для Illumina®, а секвенирование парных концевых прочтений длиной 150 п. н. выполняли на HiSeq1500.

Небольшое повышение температуры было обнаружено у всех свиной, инфицированных штаммом КК262, на 4–6 день dpi, других клинических признаков болезни не было отмечено до конца периода наблюдения. После заражения штаммом К49 у животных группы 2 развились типичные клинические признаки АЧС. Свины в группе 2 погибли или были подвергнуты эвтаназии через 7–9 дней после инфицирования.

У животных, инфицированных штаммом КК262, антитела против вируса АЧС были обнаружены через 14–30 дней после инокуляции. Все пробы сыворотки, отобранные у животных, инфицированных штаммом К49, были отрицательными, что связано с ранней гибелью животных. Геном вируса АЧС (10^2 – 10^4 копий/мл) был обнаружен с помощью количественной ПЦР в образцах крови, отобранных у животных, инфицированных штаммом КК262, на 7–30 dpi. Значительно более высокие уровни вирусной нагрузки (до 10^{11} копий/мл) были отмечены у животных, инфицированных К49. Важно отметить, что в органах животных, инфицированных штаммом КК262, были обнаружены очень низкие или неопределяемые количества генома вируса АЧС (10^2 – 10^5 копий/мл). Напротив, высокие титры вируса АЧС (10^7 – 10^8 копий/мл) были обнаружены в образцах органов животных, инфицированных К49.

Мы также показали, что различия в репликации и вирулентности штаммов КК262 и К49 *in vivo* не связаны с репликацией вируса *in vitro* в макрофагах свиной.

Сравнение двух геномов показало, что основные изменения приходились на левую вариабельную область (LVR). Самым большим отличием генома КК262 является делеция 8811 нуклеотидов в области мультигенных семейств MGF360/MGF505. Делеция затронула пять генов MGF360 (MGF360-10La, MGF360-11L, MGF360-12L, MGF360-13L и MGF360-14L) и три гена MGF505 (MGF505-1R, MGF505-2R и MGF505-3R). Проведенный нами сравнительный анализ геномов аттенуированных и вирулентных штаммов других серотипов (3, 4 и 5 серотипов) позволил также выявить делеции в данной области у авирулентных вариантов.

Полученные нами результаты подтверждают, что указанные гены MGF360/MGF505 связаны с вирулентностью вируса и представляют собой основные целевые гены для направленной модификации генома с целью получения рекомбинантных вакцинных штаммов против различных серотипов. В дальнейшем гипотеза будет проверена путем создания штамма вируса АЧС 8 серотипа (циркулирующего в России) с делецией данной области генома.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-253

**ПАРВОВИРУС СВИНЕЙ 6-ГО ГЕНОТИПА В РОССИИ,
РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА *IN VITRO******PORCINE PARVOVIRUS TYPE 6 IN RUSSIA, DISTRIBUTION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION**

А. К. Комина, А. М. Аноятбекова

*Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, Москва*

А. К. Komina, A. M. Anoyatbekova

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Scriabin and Y. R. Kovalenko

✉ Komina.A.K@yandex.ru

Аннотация

Цель данного исследования заключалась в идентификации парвовируса свиней 6 генотипа (PPV6) в свиноводческих хозяйствах России и его изучение *in vitro*. В ходе исследования была протестирована 521 проба сыворотки крови от свиней различных возрастов из семи регионов России. Общая распространенность PPV6 в России составляет 9,4 %. Исследования по изучению вируса *in vitro* показали, что вирус культивируется в перевиваемых культурах клеток СПЭВ и ПС.

Abstract

The present study demonstrates the identification of Porcine parvovirus 6 (PPV6) in Russia and its characterization *in vitro*. During the study, we investigated 521 serum samples collected from pigs of different ages from seven regions of the Russia. The overall prevalence of PPV6 in Russia is 9,4 %. *In vitro* studies of the virus demonstrated that the virus accumulates in SPEV and SK continuous cell cultures.

Введение

Болезни, вызываемые парвовирусами, наносят экономический ущерб животноводству во всем мире. Для свиноводства серьезную угрозу представляет парвовирусная инфекция свиней (ПВИС), вызванная парвовирусом 1 типа, которая характеризуется нарушением репродуктивной функции свиноматок, вызывающим бесплодие, рождение мумифицированных плодов, гибель эмбрионов и новорожденных поросят [1]. В последнее десятилетие обнаруженные у свиней новые парвовирусы (PPV2–PPV7) ставят вопрос о необходимости изучения их биологических и культуральных свойств [1, 2]. Парвовирус свиней 6 генотипа впервые был выявлен в абортинных плодах свиньи в Китае в 2014 г. [3]. С момента первого обнаружения PPV6 идентифицировали в Бразилии, Южной Корее, Испании, Польше, США и Канаде [1, 2, 3]. Однако статус России по парвовирусу свиней 6 генотипа оставался неопределенным, и данные об изоляции вируса в культурах клеток крайне ограничены.

Результаты

В период с 2021 по 2022 г. методом ПЦР была исследована 521 проба сыворотки крови от поросят, свиноматок и хряков. Образцы были получены из Вологодской, Кемеровской, Московской, Томской, Свердловской областей, Красноярского края и Республики Бурятия. Результаты наших исследований впервые показали, что на территории России циркулирует PPV6. Общая распространенность парвовируса свиней в России составляет 9,4 %. ДНК вируса была найдена в сыворотках крови в 4 регионах из 7: так, в Красноярском крае — 18,2 % (n = 154), Томской области — 14,3 % (n = 91), Кемеровской области — 11,9 % (n = 59) и Московской области — 2,0 % (n = 50). Однако в трех свиноводческих хозяйствах Вологодской и Свердловской областей и Республике Бурятия ДНК PPV6 не выявлена.

Мы провели шесть последовательных пассажей вируса в перевиваемых культурах клеток СПЭВ, ПС и ПТП. Результаты ПЦР-анализа инфицированных культур клеток показали, что наиболее перспективными для изоляции PPV6 являются перевиваемые культуры клеток СПЭВ и ПС. Заражение парвовирусом проводили в момент посева на культурах клеток, поскольку для изоляции вируса необходимы культуры клеток с высокой митотической активностью. Несмотря на то что большинство известных штаммов парвовирусов свиней являются цитопатогенны-

* Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН № FGUG-2022-0010.
© А. К. Комина, А. М. Аноятбекова, 2023

ми, в нашем исследовании цитопатическое действие вируса не наблюдали, явных отличий контрольных культур клеток от зараженных не отмечали.

Для изучения внутриклеточных изменений мы применили цитологическое окрашивание инфицированных препаратов азур-эозином по Романовскому — Гимзе. В наших препаратах, прежде всего, наблюдали апоптоз клеток, в частности, изменения морфологии ядра, что характерно при инфицировании различными парвовирусами. Общими признаками заражения в культурах клеток СПЭВ и ПС РРV6 являются набухание или же увеличение ядер и ядрышек, пикноз ядер с последующей фрагментацией, маргинация и конденсация хроматина, образование симпластов, содержащих от 5 до 7 ядер, а также увеличение числа различных патологических митозов.

Выводы

В данном исследовании впервые показано присутствие парвовируса свиней 6 генотипа в некоторых регионах России. Однако его патогенез, пути проникновения и распространения в стадах свиней, взаимодействие с иммунной системой животных и влияние на свиноводческую промышленность остаются малоизученными. Выделение и характеристика РРV6 *in vitro* является первым важным шагом, который позволит нам изучить этот новый парвовирус.

Литература

1. Streck A. F., Truyen U. Porcine parvovirus // Current issues in molecular biology. 2020. Т. 37. №. 1. С. 33–46.
2. Jager M. C. et al. Small but mighty: old and new parvoviruses of veterinary significance // Virology Journal. 2021. Vol. 18. P. 1–29.
3. Ni J. et al. Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China // Virology journal 2014. Vol. 11, № 1. P. 1–8.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-254

ПРОТИВООСПЕННАЯ ВАКЦИНАЦИЯ В НИЗКОЙ ДОЗЕ НА МОДЕЛИ МЫШЕЙ***LOW-DOSE SMALLPOX VACCINATION IN A MOUSE MODEL**

Ю. В. Коняхина, А. А. Сергеев, К. А. Титова, С. А. Пьянков, С. Н. Якубицкий, С. Н. Щелкунов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

Yu. V. Konyakhina, A. A. Sergeev, K. A. Titova, S. A. Pyankov, S. N. Yakubitskiy, S. N. Shchelkunov

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ iuliakonyahina@yandex.ru

Аннотация

Штаммы вируса осповакцины (VACV) обуславливали более выраженную продукцию антител при внутрикожной (в/к) инъекции по сравнению с скарификационной (с/к) инокуляцией. Для проверки развившегося протективного иммунитета на 62-й день после вакцинации (дпв) мышей интраназально (и/н) инфицировали вирусом оспы коров. Результаты показали, что в/к инъекция обеспечивает развитие защитного иммунитета у мышей в большей степени по сравнению с с/к инокуляцией штаммов VACV.

Abstract

Vaccinia virus (VACV) strains caused a more pronounced production of antibodies with intradermal (i.d.) injection compared to scarification (s.s.) inoculation. To test for developed protective immunity at 62 day post vaccination (dpv), mice were intranasally infected with a cowpox virus. The results showed that i.d. injection provided the development of protective immunity in mice to a much greater extent compared to s.s. inoculation with VACV strains.

Целью данной работы явилось сравнение с/к и в/к способов противооспенной иммунизации на модели мышей при использовании прототипных вакцин второго и четвертого поколений в низкой дозе 10^4 бляшкообразующих единиц (БОЕ). Эксперименты выполняли на взрослых мышах линии BALB/c возраста 6–7 недель, штаммы LIVP или LIVP-GFP VACV вводили в кожу хвоста с/к или в/к способами.

Сравнение динамик развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию мышей вирусами LIVP и LIVP-GFP

Для проверки уровня гуморального иммунитета у мышей (по 6 животных каждой группы) через 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дпв проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли титры VACV-специфичных IgG в каждой индивидуальной сыворотке крови.

После в/к вакцинации вирусом LIVP существенная продукция IgG выявлялась уже на 7 дпв и достигала максимума на 21 дпв, сохраняясь практически на том же уровне до 28 дпв. Затем наблюдали постепенное снижение уровня VACV-специфичных IgG к 42 и 56 дпв (рис. 1). При с/к инокуляции мышей вирусом LIVP синтез специфичных IgG происходил с запозданием и с меньшей интенсивностью по сравнению с в/к иммунизацией (см. рис. 1).

При в/к иммунизации мышей вирусом LIVP-GFP уровень продукции IgG был значительно ниже по сравнению с LIVP вакцинацией и максимум продукции этих антител приходился на 28 дпв (см. рис. 1). Введение вируса LIVP-GFP методом с/к обуславливало меньшую продукцию анализируемых IgG (см. рис. 1).

Проверка защиты иммунизированных мышей от повторной летальной ортопоксвирусной инфекции

Для проверки уровня протективного иммунитета, развившегося у мышей в ответ на иммунизацию вирусами LIVP или LIVP-GFP с/к или в/к методами, использовали и/н инфицирование этих животных высоколетальной дозой вируса оспы коров (CPXV). Такой подход считается наиболее адекватным для оценки эффективности VACV вакцинации на модели мышей [1, 2]. Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 2, показывают, что полная защита была только в группе мышей, в/к иммунизированных вирусом LIVP. В группе мышей, вакцинированных этим же вирусом, используя с/к метод, 83 % животных после заражения штаммом GRI-90 CPXV погибли (см. рис. 2).

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-14-00006-П.

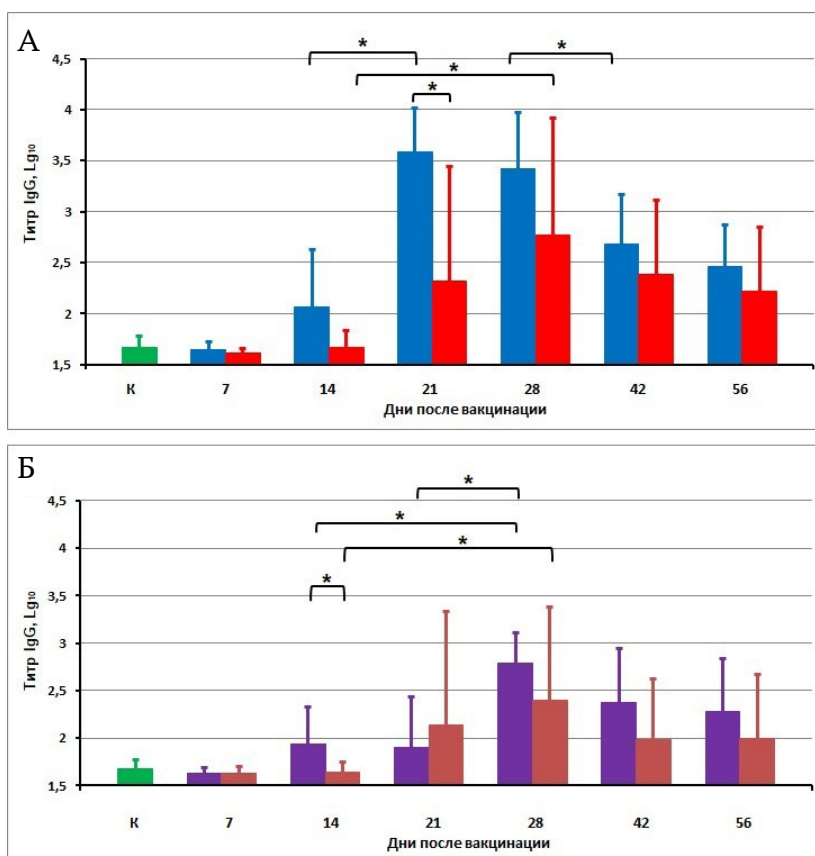


Рис. 1. Титры VACV-специфичных IgG в сыворотках мышей, иммунизированных вирусами LIVP (А) или LIVP-GFP (Б). К — сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор. Обозначения: LIVP, в/к инъецированный — голубой; с/к инокулированный — красный. LIVP-GFP, в/к инъецированный — фиолетовый; с/к инокулированный — коричневый. * — статистически достоверные различия при $P \leq 0.05$

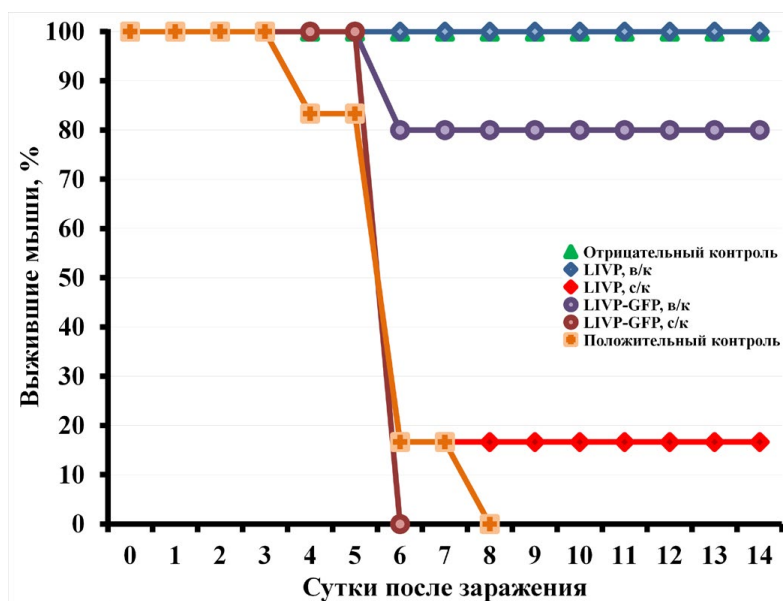


Рис. 2. Динамика гибели мышей, иммунизированных вирусами LIVP или LIVP-GFP в дозе 10^4 БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 46 LD_{50} на 62-й день после вакцинации. Приведены данные для групп из 6 животных, иммунизированных соответствующими вирусами, а также неиммунизированных групп и неинфицированных (Отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (Положительный контроль)

В/к инъекция вируса LIVP-GFP обеспечила в тех же условиях повторной инфекции, вызванной штаммом GRI-90 CPXV, защиту 80 % мышей, а все мыши, с/к инокулированные LIVP-GFP, погибли (см. рис. 2).

Таким образом, при малой дозе VACV (10^4 БОЕ), использованной в данной работе для иммунизации мышей, в/к инъекция демонстрирует явное преимущество ($P \leq 0.05$, при сравнении двухсторонним точным критерием Фишера) перед с/к инокуляцией в формировании протективного иммунитета против гетерологичной ортопоксвирусной инфекции (оспы коров). Следует также отметить еще одно преимущество — в/к иммунизация, по данным литературы, кроме более точного дозирования вакцины по сравнению с с/к процедурой, приводит к гораздо меньшему повреждению кожи и тем самым предотвращает развитие бактериальных инфекций в зоне введения вакцины [3].

Литература

1. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Tournier J.-N., Garin D., Crance J.-M. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 4809–4817. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.04.011
2. Melamed S., Paran N., Katz L., Ben-Nathan D., Israely T., Schneider P., Levin R., Lustig S. Tail scarification with vaccinia virus Lister as a model for evaluation of smallpox vaccine potency in mice // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 7743–7753. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.023
3. Shmeleva E. V., Gomez de Agüero M., Wagner J., Enright A. J., Macpherson A. J., Ferguson B. J., Smith G. L. Smallpox vaccination induces a substantial increase in commensal skin bacteria that promote pathology and influence the host response. *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. P. e1009854.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-255

АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ ОМИКРОН ХВВ.1 И CL.1 ВИРУСА SARS-COV-2***ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF SARS-COV-2 XBB.1 AND CL.1 OMICRON VARIANTS**

К. С. Кудря, М. В. Сергеева, А. Б. Комиссаров, Д. М. Даниленко

НИИ группа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

K. S. Kudrya, M. V. Sergeeva, A. B. Komissarov, D. M. Danilenko

Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

✉ kira336@yandex.ru

Аннотация

Аминокислотные мутации в S-белке коронавируса SARS-CoV-2 приводят к появлению новых вариантов вируса, успешно ускользающих от иммунного ответа. Своевременная антигенная характеристика новых вариантов вируса важна для оценки потенциального риска снижения эффективности вакцин и популяционного иммунитета. В данной работе мы сравнили подходы к оценке антигенных свойств вариантов ХВВ.1 и CL.1 с использованием сывороток переболевших и вакцинированных людей и сывороток наивных иммунизированных животных.

Abstract

Mutations occurring in the S protein of the SARS-CoV-2 virus result in the emergence of novel virus variants that effectively evade the immune response. It is crucial to conduct comprehensive antigenic characterization of these new viruses in order to evaluate the potential threat they pose to vaccine effectiveness and herd immunity. In this study, we employed various methods to assess the antigenic characteristics of the XBB.1 and CL.1 variants. This involved analyzing sera obtained from individuals who had recovered from the infection or received vaccination, as well as sera from immunized animals with no prior exposure to the virus.

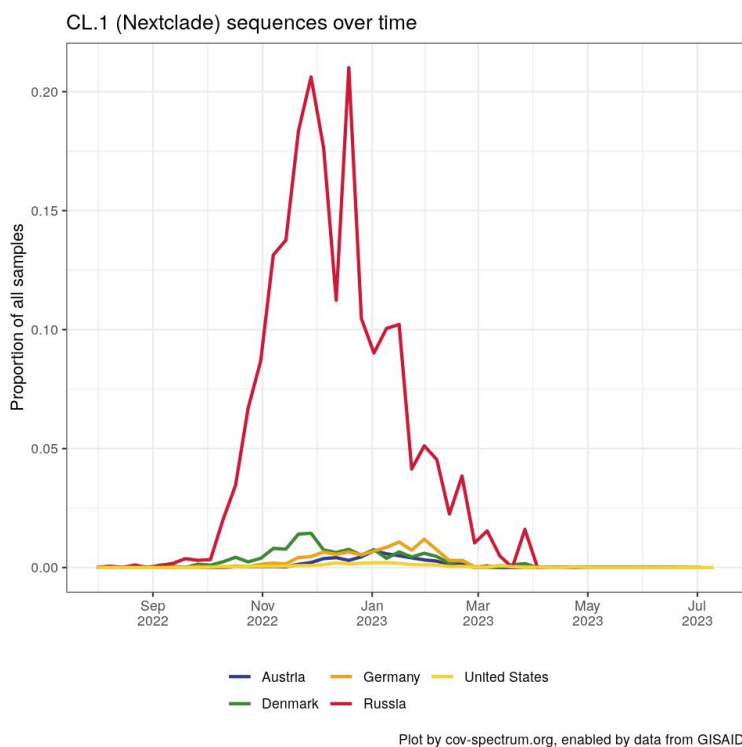


Рис. 1. Динамика распространения варианта CL.1 в мире

Введение

С момента своего выявления в Китае в конце 2019 г. новый коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной не менее 630 миллионов подтвержденных инфекций и 6,6 миллиона смертей во всем мире [1]. Высокая заболеваемость и смертность связаны в том числе с быстрой эволюцией вируса и, как следствие, его ускользанием от иммунного ответа.

В конце 2021 г. в Южной Африке был обнаружен вариант омикрон (линия BA.1), в белке S которого было 43 мутации [2]. Мутации обеспечивали лучшее связывание с ACE2 и почти полное ускользание от нейтрализующих антител к более ранним вариантам [3]. В августе 2022 г. в России была выявлена уникальная линия CL.1, содержащая 3 аминокислотные замены в антигенных сайтах белка S относительно родительской линии BA.5. Доля линии CL.1 прогрессивно возрастала во втором полугодии 2022 г. и начала снижаться только в 2023 г. с распространением варианта ХВВ (рис. 1).

* Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Долгосрочная оценка коллективного иммунитета и эффективности специфической профилактики населения в условиях динамической циркуляции возбудителей COVID-19 и гриппа в Российской Федерации».

Линия ХВВ возникла в результате рекомбинации совместно циркулирующих вариантов омикрон ВА.2, ВJ.1 и VM.1.1.1 [4]. В марте 2023 г. доминирующим вариантом стал ХВВ.1.5.

Своевременная антигенная характеристика новых вариантов коронавируса важна для оценки потенциального риска снижения эффективности вакцин и популяционного иммунитета. Целью данной работы было изучить и сравнить антигенные характеристики вариантов омикрон CL.1 и ХВВ.1.5 с использованием сывороток переболевших и вакцинированных людей и сывороток иммунизированных животных.

Материалы и методы

Вирусы SARS-CoV-2 линий В.1, ВА.1, CL.1, ХВВ.1.5 и ХВВ.1.16 выделяли из клинических образцов (назофарингеальных мазков и мазков из зева) и культивировали в клетках VeroE6/TMPRSS2 (JCRB1819, Национальный институт инфекционных болезней, Токио, Япония). Инактивацию вирусов проводили добавлением формалина в соотношении 1:1000, очистку вирусов осуществляли методом ультрацентрифугирования через 30 % раствор сахарозы в буфере NTE.

Мышей BALB/c иммунизировали инактивированными очищенными вирусами В.1, CL.1 и ХВВ.1.5 с адьювантом, после чего проводили забор сывороток крови (рис. 2).

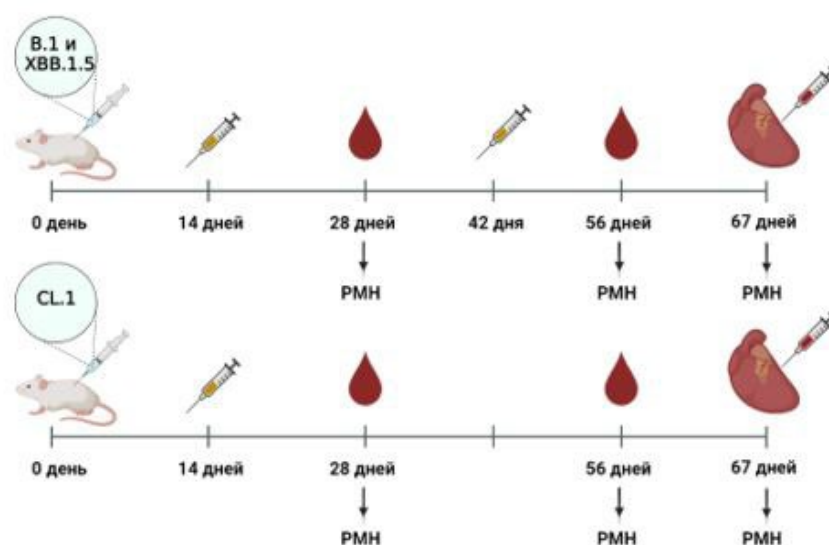


Рис. 2. Схема иммунизации животных

Сыворотки привитых добровольцев, прошедших первичную и повторную (через год) вакцинацию, были получены в конце 2021 г. Сыворотки реконвалесцентов были получены от добровольцев, перенесших COVID-19 в начале 2023 г.; генетическую принадлежность вируса у переболевших добровольцев подтверждали секвенированием возбудителя непосредственно из клинического материала с определением генетической линии в острой фазе болезни.

Постановку реакции микронейтрализации осуществляли классическим методом. Сыворотки смешивали со 100 ТИД50 вируса, заражали клетки Vero CCl-81 и инкубировали 3–5 суток. Титром сыворотки считали наибольшее разведение, при котором отсутствовало цитопатическое действие вируса.

Результаты

Антигенную характеристику вариантов ХВВ.1.5 и CL.1 вируса SARS-CoV-2 проводили в реакции микронейтрализации с сыворотками волонтеров (вакцинированных и/или переболевших), а также сыворотками иммунизированных животных.

У вакцинированных волонтеров наблюдали высокие титры нейтрализующих антител к референс-штамму В.1 (близок к варианту Ухань), значительно меньшую нейтрализующую активность к линии омикрон ВА.1 и полное отсутствие нейтрализации вариантов CL.1, ХВВ.1.5 и ХВВ.1.16 (рис. 3). У реконвалесцентов, перенесших инфекцию SARS-CoV-2 линии ХВВ, титры нейтрализующих антител к линиям CL.1, ХВВ.1.5 и ХВВ.1.16 были немного ниже, чем к предковой линии ВА.1. При этом титры к референс-штамму В.1 также были ниже, чем к варианту омикрон ВА.1, хотя и оставались на высоком уровне.

Мышиные антисыворотки к линии В.1 демонстрировали высокую нейтрализующую активность к данному вирусу, при этом в отношении остальных вариантов активность была низкой или отсутствовала (ниже предела

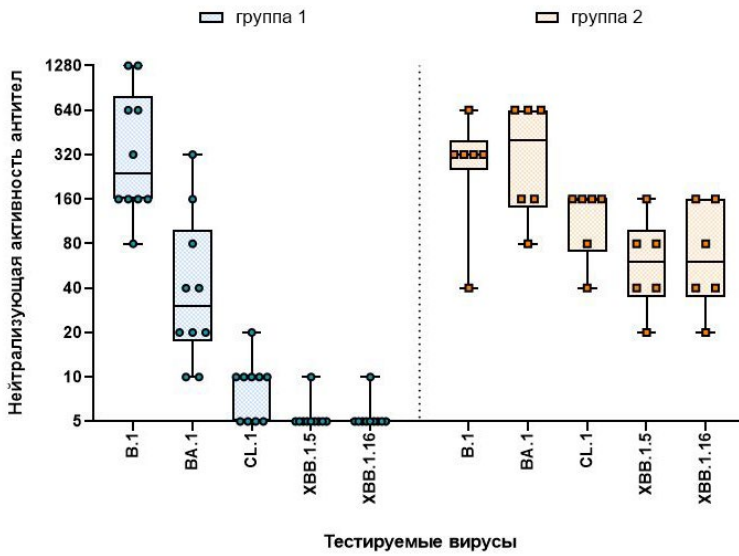


Рис. 3. Нейтрализующая активность антител в сыворотках, привитых (группа 1) и реконвалесцентов XBB (группа 2) в отношении различных линий SARS-CoV-2

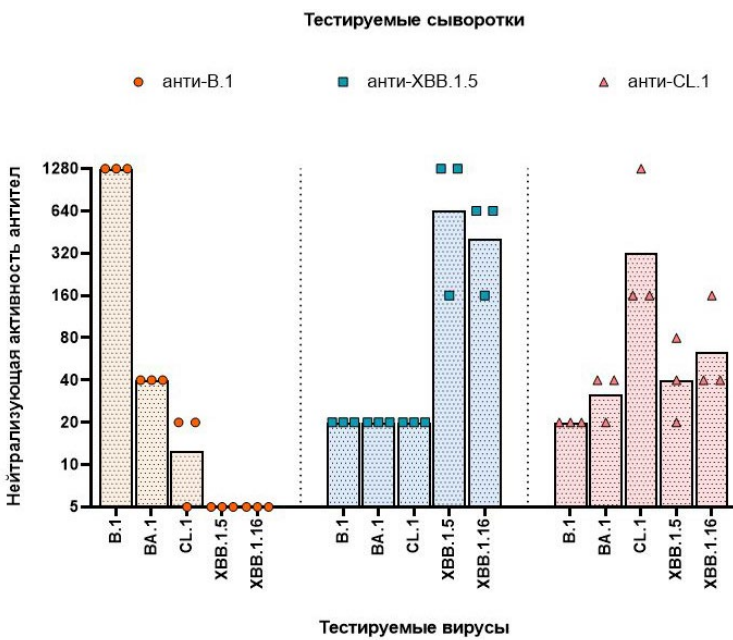


Рис. 4. Нейтрализующая активность антител в сыворотках мышей, иммунизированных вирусами B.1, XBB.1.5 и CL.1

детекции) (рис. 4). Антисыворотка к варианту XBB.1.5 нейтрализовала вирусы линий XBB.1.5 и XBB.1.16 и не обладала активностью в отношении вариантов CL.1, BA.1 и B.1. Антисыворотка к варианту CL.1 нейтрализовала данный вариант, а также продемонстрировала некоторую перекрестную активность в отношении предковой линии BA.1 и группы XBB, и не нейтрализовала референс-штамм линии B.1.

Заключение

Проведенные исследования позволяют заключить, что сыворотки наивных иммунизированных животных лучше демонстрируют антигенные различия между вариантами SARS-CoV-2, но не позволяют оценить эффект от проведенных вакцинаций и перенесенных инфекций, в то время как сыворотки реконвалесцентов дают возможность оценить иммунный статус популяции, но слабо подходят для антигенной характеристики отдельных вариантов возбудителя. Одновременное использование двух подходов является более информативным при оценке рисков, связанных с новыми вариантами коронавируса.

Литература

1. Ritchie, et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Our World in Data. Retrieved 29 July 2023.
2. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of viral diseases, in *CDC COVID-19 Science Briefs* (Centers for Disease Control and Prevention, 2020).
3. W. R. Gallaher, et al. Omicron is a multiply recombinant set of variants that have evolved over many months, 2022; <https://virological.org/t/omicron-is-a-multiply-recombinant-set-of-variants-that-have-evolved-over-many-months/775> [accessed 18 February 2022].
4. Karyakarte, Rajesh P et al. "Chasing SARS-CoV-2 XBB.1.16 Recombinant Lineage in India and the Clinical Profile of XBB.1.16 Cases in Maharashtra, India." *Cureus* vol. 15,6 e39816. 1 Jun. 2023, DOI:10.7759/cureus.39816

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-256

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ КОИНФИЦИРОВАНИЯ SARS-COV-2 С НЕПАТОГЕННЫМ ВАРИАНТОМ ВИРУСА КОКСАКИ А7 (ШТАММ LEV-8) И ЭНТЕРОВИРУСОМ 71***STUDY OF THE EFFECTS OF SARS-COV-2 CO-INFECTION WITH A NON-PATHOGENIC VARIANT OF THE COXSACKIE A7 VIRUS (LEV-8 STRAIN) AND ENTEROVIRUS 71**

С. С. Легостаев, Е. В. Протопопова, Р. Ю. Лутковский, В. А. Святченко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

S. S. Legostaev, E. V. Protopopova, R. Yu. Lutkovsky, V. A. Svyatchenko

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ legostaev_ss@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе представлены результаты исследования эффектов коинфицирования SARS-CoV-2 с непатогенным для человека штаммом LEV-8 (живая энтеровирусная вакцина) вируса Коксаки А7 и энтеровирусом 71 (EV71) на модели клеточных культур и лабораторных животных. В экспериментах *in vitro* показано, что при инфицировании энтеровирусы и SARS-CoV-2 оказывают друг на друга конкурентное ингибирующее воздействие с более выраженной степенью угнетения в отношении SARS-CoV-2. При моделировании коинфицирования SARS-CoV-2 с энтеровирусами на лабораторных животных показано, что предварительное инфицирование энтеровирусами приводит к выраженному ингибированию репликации SARS-CoV-2 в легких коинфицированных животных и более быстрому освобождению нижних дыхательных путей от инфекционного вируса SARS-CoV-2, а также к уменьшению выраженности клинических проявлений коронавирусной инфекции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые энтеровирусы при коинфицировании обладают выраженной интерферирующей активностью, проявляющейся в резком ингибировании инфекционной активности SARS-CoV-2.

Abstract

The paper presents the results of the study of the effects of co-infection of SARS-CoV-2 with non-pathogenic for humans strain LEV-8 (live enterovirus vaccine) of Coxsackie virus A7 and enterovirus 71 (EV71) on the model of cell cultures and laboratory animals. In vitro experiments showed that during infection enteroviruses and SARS-CoV-2 have a competitive inhibitory effect on each other, with a more pronounced degree of suppression of SARS-CoV-2. Modeling of SARS-CoV-2 co-infection with enteroviruses in laboratory animals showed that preliminary infection with enteroviruses leads to a pronounced inhibition of SARS-CoV-2 replication in the lungs of co-infected animals and a faster release of the lower respiratory tract from infectious SARS-CoV-2 virus, as well as to a decrease in the severity of clinical manifestations of coronavirus infection. The results obtained indicate that the studied enteroviruses have a pronounced interfering activity during co-infection, which manifests itself in a sharp inhibition of the infectious activity of SARS-CoV-2.

Введение

SARS-CoV-2 вызывает широкий спектр клинических проявлений, начиная от бессимптомной формы и заканчивая тяжелым или критическим заболеванием. По данным ряда исследований, коинфекция SARS-CoV-2 с другими респираторными вирусами может усугублять течение заболевания и вызывать неблагоприятные исходы по сравнению с моноинфекцией. Случаи коинфицирования пациентов SARS-CoV-2 с рино/энтеровирусами составляют до 14 % от общего количества коинфицирования с респираторными вирусами. Особенности инфекционного процесса, клинические проявления, тяжесть заболевания и прогноз у больных с коинфекцией SARS-CoV-2 и рино/энтеровирусами остаются неясными и неочевидными.

Целью работы явилось исследование эффектов коинфицирования SARS-CoV-2 с энтеровирусами на модели клеточных культур и лабораторных животных. В качестве коинфицирующих агентов использовали не патогенный для человека штамм LEV-8 вируса Коксаки А7, для которого ранее была показана выраженная интерферирующая активность в отношении респираторных вирусов и энтеровирус 71 (EV71).

Результаты

Коинфекцию SARS-CoV-2 с энтеровирусами *in vitro* моделировали при одновременном и последовательном заражении клеток перmissive для всех трех вирусов клеток Vero E6 (см. таблицу). Одновременное ин-

* Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2019-1665)

инфицирование SARS-CoV-2 и LEV-8 либо EV71 клеток Vero E6 с одинаковой множественностью приводит к взаимному ингибированию накопления инфекционных вирусов в инфицированных клетках, более выраженному в отношении SARS-CoV-2 (таблица А). При последовательном заражении LEV-8 или EV71 и через 1 сутки SARS-CoV-2 (табл. Б) инфекционные титры SARS-CoV-2 при коинфекции через 24 и 48 ч после инфицирования SARS-CoV-2 были на 3–4 lg ниже, чем в случае моноинфекции SARS-CoV-2. При проведении обратного эксперимента показано, что предварительное заражение SARS-CoV-2 приводит к статистически значимому, но более чем на 2 lg, снижению в накоплении инфекционных энтеровирусов (таблица Б).

Моделирование коинфекции SARS-CoV-2 с LEV-8 или EV71 in vitro при одновременном (А) и последовательном (Б) инфицировании клеток Vero E6 (MOI 0.1 lgТЦД₅₀)

А

Время после инфицирования	Моноинфекция				Коинфекция	
	SARS-CoV-2		LEV-8		SARS-CoV-2 + LEV-8	
	Вирусный титр, lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка, lg копий/мл	Вирусный титр, lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка, lg копий/мл	Вирусный титр, SARS-CoV-2/LEV8, lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка, SARS-CoV-2/LEV-8, lg копий/мл
24 ч	4.8±0.3	6.6±0.4	5.2±0.3	7.0±0.3	2.3±0.3/3.5±0.3	4.6±0.3/5.6±0.3
48 ч	6.9±0.4	8.4±0.3	7.3±0.4	8.6±0.4	3.8±0.4/5.8±0.3	5.5±0.3/7.3±0.3
	SARS-CoV-2		EV71		SARS-CoV-2 + EV71	
24 ч	5.2±0.3	7.0±0.4	5.6±0.3	7.4±0.3	2.2±0.3/3.3±0.3	4.3±0.3/5.4±0.3
48 ч	7.3±0.4	8.5±0.3	7.5±0.4	9.0±0.4	3.5±0.4/5.4±0.3	5.3±0.3/7.1±0.3

Б

Время после инфицирования SARS-CoV-2	Вирусный титр (SARS-CoV-2/LEV-8), lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка (SARS-CoV-2/LEV-8), lg копий/мл	Вирусный титр, lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка, lg копий/мл
LEV-8 -24ч- SARS-CoV-2		PBS -24ч-SARS-CoV-2		
24 ч	2.7±0.3/6.9±0.4	4.4±0.3 / 8.2±0.4	5.1±0.4	7.7±0.3
48 ч	3.2±0.3/7.3±0.4	4.8±0.4 / 9.1±0.3	7.2±0.4	9.3±0.4
SARS-CoV-2 -24ч- LEV-8		PBS -24ч- LEV-8		
48 ч	6.3±0.3 / 5.9±0.4	8.0±0.4 / 7.8±0.3	5.3±0.3	7.1±0.3
72 ч	5.0±0.4 / 5.6±0.4	6.9±0.3 / 7.4±0.4	7.5±0.4	9.2±0.3
Время после инфицирования SARS-CoV-2	Вирусный титр (SARS-CoV-2/EV-A71), lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка (SARS-CoV-2/ EV-A71), lg копий/мл	Вирусный титр, lgТЦД ₅₀ /мл	Вирусная нагрузка, lg копий/мл
EV71 -24ч- SARS-CoV-2		PBS -24ч-SARS-CoV-2		
24 ч	2.9±0.3 / 4.9±0.2	4.7±0.3 / 6.5±0.2	5.2±0.3	7.3±0.3
48 ч	3.1±0.3 / 6.5±0.4	5.0±0.4 / 8.2±0.3	7.1±0.4	8.7±0.4
SARS-CoV-2 -24ч- EV71		PBS -24ч- EV71		
48 ч	5.8±0.4 / 5.3±0.4	7.6±0.3 / 7.1±0.3	6.8±0.3	8.3±0.4
72 ч	4.7±0.3 / 5.1±0.3	7.0±0.3 / 7.2±0.4	6.5±0.4	8.0±0.3

Коинфекция хомяков SARS-CoV-2 и LEV-8 или EV71 и моноинфекция SARS-CoV-2 приводят к таким клиническим признакам, как вялость, взъерошенная шерсть, сгорбленная спина и учащенное дыхание. Эти проявления были более выражены у моноинфицированных SARS-CoV-2 хомяков. Заражение лишь SARS-CoV-2 сопровождалось средним снижением веса в группе животных на 12 % (рис. 1). В группах «SARS-CoV-2/LEV-8» и «SARS-CoV-2/EV71» наблюдалось значительно меньшее снижение средней массы животных, 3 % и 5 % соответственно. Животные, которых интраназально моноинфицировали LEV-8 или EV71, не теряли в весе в течение периода наблюдения.

Чтобы определить, была ли коинфекция SARS-CoV-2 с LEV-8 или EV71 кооперативной или конкурентной, определяли титр вирусов и вирусную нагрузку в легких (рис. 2). У хомяков, моноинфицированных SARS-CoV-2, обнаруживались значительно более высокие уровни инфекционного вируса через 3 дня после инфицирования, чем у коинфицированных с LEV-8 или EV71. Через 6 дней после инфицирования инфекционный SARS-CoV-2 в легких коинфицированных хомяков не определялся, при этом высокие концентрации SARS-CoV-2 определялись у моноинфицированных SARS-CoV-2 хомяков.

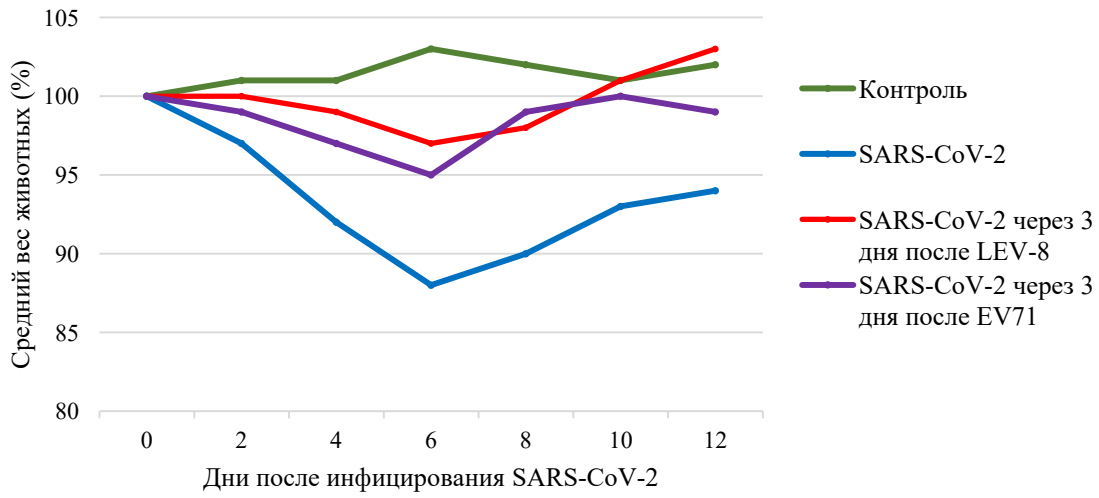


Рис. 1. Изменения среднего веса тела у моноинфицированных SARS-CoV-2 и коинфицированных с энтеровирусами хомяков

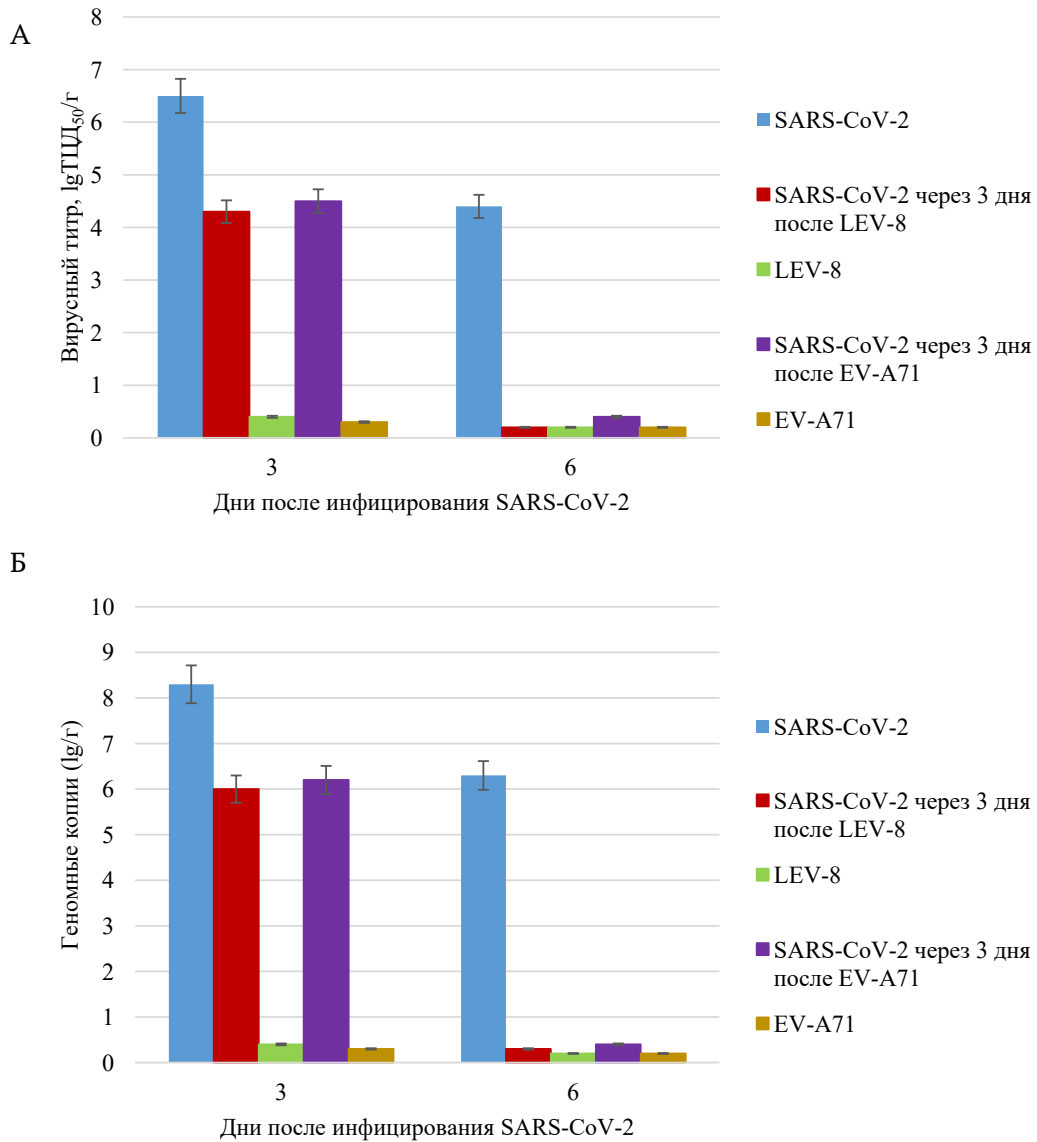


Рис. 2. Репликационная активность SARS-CoV-2 у моноинфицированных и коинфицированных с энтеровирусами хомяков: А — инфекционный титр; Б — вирусная нагрузка

Исследование уровней интерферон/цитокинового ответов проводили посредством определения хемокин/цитокинового мРНК профиля в сыворотках крови моно- и коинфицированных SARS-CoV-2 и LEV-8 животных количественным ПЦР-анализом. Моноинфекция LEV-8 и SARS-CoV-2 (рис. 3) приводила к повышению уровня мРНК, участвующих в сигнальных путях интерферонового и цитокинового ответов, этот индукционный эффект более выражен в отношении LEV-8. Значительное повышение уровня мРНК интерферонов типа I и II указывает на то, что LEV-8 эффективно запускает врожденный иммунный ответ. Как видно, преинфекция животных LEV-8 вызывает выраженное усиление экспрессии генов, кодирующих IFN α , IFN γ , IL12, CCR4, CCL22, IL10 и IL21 у коинфицированных животных.

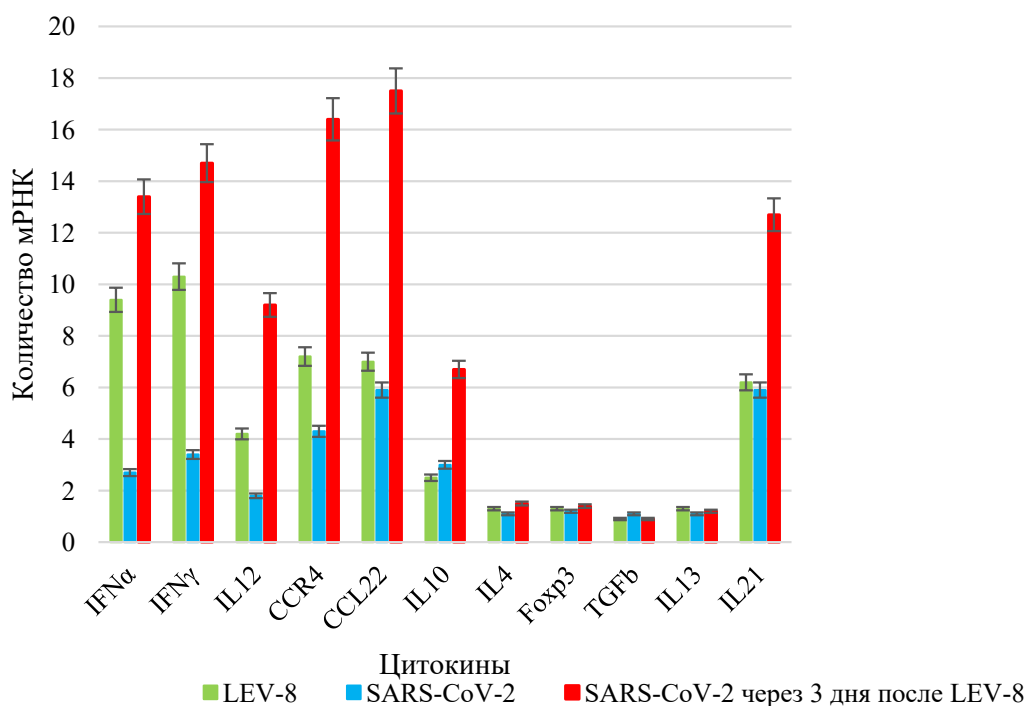


Рис. 3. Хемокин/цитокиновый мРНК-профиль в сыворотках крови моно- и коинфицированных SARS-CoV-2 и LEV-8 хомяков

Заключение

Представленные результаты исследования эффектов коинфицирования SARS-CoV-2 с энтеровирусами *in vitro*, показывают, что при одновременном и последовательном (с различной очередностью и множественностью) инфицировании вирусы оказывают друг на друга конкурентное ингибирующее воздействие, с более выраженной степенью угнетения в отношении SARS-CoV-2.

При моделировании коинфицирования SARS-CoV-2 с энтеровирусами *in vivo* показано, что предварительное инфицирование энтеровирусами приводит к выраженному ингибированию репликации SARS-CoV-2 в легких коинфицированных животных и к снижению уровня клинических проявлений инфекции SARS-CoV-2.

Исследование интерферон/цитокинового ответов показало индукцию врожденного иммунного ответа непатогенным энтеровирусным штаммом LEV-8, обеспечивающую достоверную защиту животных от последующего инфицирования SARS-CoV-2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-257

СИНТЕЗИРУЕМЫЙ КЛЕТКАМИ НЕСТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК 1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА АССОЦИИРОВАН С ЭКЗОСОМАМИ И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ СЕКРЕЦИЮ***CELL-SYNTHESIZED NON-STRUCTURAL PROTEIN 1 OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IS ASSOCIATED WITH EXOSOMES AND INCREASE THEIR SECRETION**

Е. А. Назаренко, Е. С. Стародубова

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

E. A. Nazarenko, E. S. Starodubova

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ nazarenkoekaterinaA@yandex.ru

Аннотация

Последние исследования предполагают важность внеклеточных везикул (ВВ) в патогенезе вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), но влияние отдельных вирусных белков на них еще не изучено. В данной работе показано, что экспрессия в клетках неструктурного белка 1 (NS1) ВКЭ увеличивает секрецию ВВ. Установлено, что NS1 обнаруживается во фракции экзосом, полученных при преципитации, а также при хроматографии сред культивирования клеток.

Abstract

Recent studies propose the importance of extracellular vesicles (EVs) in the pathogenesis of tick-borne encephalitis virus (TBEV), but the involvement of individual viral proteins on them has not yet been studied. In this work, it was shown that the expression of TBEV nonstructural protein 1 (NS1) in cells increases the secretion of EVs. It has been established that NS1 is found in the fraction of exosomes obtained by precipitation, as well as by chromatography of cell culture media.

В последнее время появляется все больше исследований, демонстрирующих важную роль внеклеточных везикул (ВВ) при различных вирусных инфекциях. Проводится поиск данных о задействовании ВВ в распространении вирусов и связи ВВ с противовирусным иммунным ответом. Для вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) таких исследований очень мало и данных о роли индивидуальных вирусных белков в этом процессе нет. В исследовании ВВ при инфекции клеток вирусом Лангат, который очень близок к ВКЭ [1], было показано, что инфицированные клетки насекомых и нейрональные человеческие клетки выделяют везикулы размером от 30 до 200 нм и содержат вирусную РНК, белок Е и NS1. Исследователи обнаружили, что вирус использует экзосомы клеток насекомых для доставки вирусной РНК и белков в человеческие кератиноциты и эндотелиальные клетки, а затем экзосомы, образованные этими клетками, для дальнейшего распространения вируса по организму, приводя к преодолению гематоэнцефалического барьера. Экзосомы из инфицированных еще одним флавивирусом — вирусом Денге — моноцитов или клеток, экспрессирующих NS1 вируса [2], поглощенных клетками микроглии, вызывают активацию провоспалительных генов. Внеклеточные везикулы из инфицированных вирусом Зика клеток содержат вирусную РНК, белки Е и NS1 и транспортируют их к различным клеткам центральной нервной системы [3]. Такие везикулы способны временно нарушать целостность монослоя клеток, аналогичных клеткам гематоэнцефалического барьера. Таким образом, имеющиеся литературные данные указывают на вовлеченность внеклеточных везикул инфицированных клеток и белка NS1, в частности, в запуске нейровоспаления в центральной нервной системе, поэтому изучение роли NS1 в патогенезе ВКЭ представляет интерес.

Для исследования ассоциации NS1 с внеклеточными везикулами клетки НЕК293Т трансфицировали плазмидой, кодирующей NS1 ВКЭ. В качестве контроля использовали клетки, трансфицированные вектором без вставки гена. Через двое суток собирали среду культивирования и проводили последовательное центрифугирование при $500\times g$ и $2000\times g$ для удаления живых и мертвых клеток, а затем при $10000\times g$ для удаления остатков клеток, микровезикул и апоптотических телец. Из супернатанта проводили преципитацию экзосом с использованием коммерческих наборов (Invitrogen и Transgen). Осадок с экзосомами ресуспендировали в фосфатном буфере и определяли тотальное содержание белка. Обнаружено, что в осадках, выделенных из среды культивирования клеток, экспрессирующих NS1, содержится в два раза больше белка, чем из среды клеток, трансфицированных вектором без вставки гена. Полученные на всех стадиях осадки анализировали иммуноблотингом с антителами

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-24-00627.

© Е. А. Назаренко, Е. С. Стародубова, 2023

к NS1, маркерам экзосом и клеточным белкам. С помощью антител к маркеру экзосом — TSG101 подтвердили успешное выделение экзосом, а также их более высокое содержание в образцах сред NS1-экспрессирующих клеток. Антитела к NS1 выявили наличие вирусного белка в осадках от каждой стадии центрифугирования, а также в экзосомной фракции.

Кроме того, среды культивирования трансфицированных клеток подвергали жидкостной хроматографии (FPLC) на колонке с Sephadex 200. Среды предварительно концентрировали на VivoSpin с порогом отсечения 100 кДа. Полученные в результате разделения фракции анализировали иммуноблотингом. Белок NS1 выявили во фракциях 200–300 кДа, что соответствует секретируемой гексамерной форме белка, а также в высокомолекулярной (более 600–700 кДа) фракции, что соответствует экзосомной фракции. Наличие в высокомолекулярной фракции экзосом подтвердили использованием антител к маркеру TSG101.

Таким образом, впервые было показано, что синтез в клетках неструктурного белка 1 вируса клещевого энцефалита усиливает секрецию экзосом клетками. Также обнаружено, что NS1 ВКЭ ассоциирован с экзосомами. Полученные результаты указывают на важную роль этого белка в патогенезе вируса и необходимо дальнейшее изучение механизмов воздействия NS1 на формирование внеклеточных везикул клетками.

Литература

1. Zhou W., Woodson M., Neupane B., et al. Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells // *PLoS Pathogens*. 2018. V.4. e1006764.
2. Mishra R., Lahon A., Banerjee A. C. Dengue Virus Degrades USP33-ATF3 Axis via Extracellular Vesicles to Activate Human Microglial Cells // *Journal of Immunology*. 2020. V.205. P. 1787-1798.
3. Fikatas A., Dehairs J., Noppen S., et al. Deciphering the Role of Extracellular Vesicles Derived from ZIKV-Infected hcMEC/D3 Cells on the Blood-Brain Barrier System // *Viruses*. 2021. V. 13. P. 2363.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-258

**УСТОЙЧИВОСТЬ СТРУКТУР ВИРУСНЫХ РНК ФЛАВИПОДОБНЫХ ВИРУСОВ
С СЕГМЕНТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ К XRN1 ЭКЗОНУКЛЕАЗЕ*****RESISTANCE OF VIRAL RNA STRUCTURES OF FLAVI-LIKE VIRUSES
WITH SEGMENTED GENOME TO XRN1 EXONUCLEASE**Е. В. Охезин^{1,2}, А. Г. Литов², Г. Г. Карганова²¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М. П. Чумакова РАН, МоскваE. V. Okhezin^{1,2}, A. G. Litov², G. G. Karganova²¹Lomonosov Moscow State University²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

✉ oe-74@mail.ru

Аннотация

Субгеномные ортофлавириновые РНК — это продукт неполной деградации геномной ортофлавириновой РНК 5'-3' клеточной экзорибонуклеазой XRN1. Устойчивость к полному гидролизу обуславливают консервативные мотивы вторичной структуры, локализованные на 3' конце геномной РНК. В данной работе проводится исследование экзонуклеазной устойчивости сегментов геномной РНК вируса Алонгшан в реакции *in vitro*.

Abstract

Subgenomic orthoflaviviral RNA is a product of incomplete degradation of genomic orthoflavivirus RNA by 5'-3' cell exoribonuclease XRN1. Resistance to complete hydrolysis is determined by conserved secondary structure motifs localized at the 3' end of the genomic RNA. In this research, we study the exonuclease resistance of genomic RNA segments Alonghan virus in an *in vitro* assay.

Недавно была открыта уникальная родственная роду *Orthoflavivirus* вирусная группа джангменвирусов. Геном этих вирусов представлен 4 сегментами кэпированной и полиаденилированной одноцепочечной РНК позитивной полярности. 2 сегмента кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу и хеликазу, имеющие высокую степень гомологии с другими белками известных ортофлавиринов. Кроме того, остальные сегменты кодируют белки, уникальные для данной вирусной группы. Особый интерес среди представителей этой группы вызывает вирус Алонгшан ввиду того, что он, предположительно, является патогеном человека, вызывающим заболевание с поражением ЦНС. Была отмечена его циркуляция на территории Российской Федерации в таких регионах как Калининградская, Ульяновская, Челябинская области, республики Татарстан, Карелия, Тыва и Алтай [1].

Для РНК-вирусов последовательности концевых нетранслируемых областей (НТО) генома и их высококонсервативные вторичные структуры играют ключевую роль в фундаментальных процессах жизненного цикла вирусов, таких как репликация, трансляция, транскрипция и другие. Для известных классических ортофлавиринов показано наличие уникальных субгеномных РНК (сгРНК), образование которых обуславливают высококонсервативные мотивы вторичной структуры геномной РНК устойчивые к 5'-3' гидролизу клеточной экзорибонуклеазой XRN1.

Ранее нами были отсекурованы концы геномов двух джангменвирусов — вирусов Алонгшан и Янгтоу (5 и 7 штаммов соответственно) и было показано, что при выравнивании последовательностей и моделировании структур РНК всех 4 сегментов обоих вирусов на 3' конце наблюдается 100 % консервативность нуклеотидов ЦААГУГ в позициях 354 — 359 и 372 — 377 и формирование двух ААГУ тетрапелей, образующих гантелеобразную структуру [2]. Одной из возможных биологических функций такой структуры может быть образование «ортофлавириноподобных» сгРНК. Однако компьютерный моделинг структур РНК не может дать однозначный ответ о структурной организации 3' концевых участков генома и тем более об их биологической функции.

Целью нашего исследования стало определение экзонуклеазной устойчивости к XRN1 рибозекзонуклеазе 3' концов РНК всех 4 сегментов вируса Алонгшан. Для этого в работе использовали штамм Miass 519, 3' концы

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-74-00083.

© Е. В. Охезин, А. Г. Литов, Г. Г. Карганова, 2023

которого были получены при помощи ПЦР с использованием высокоточной полимеразы и прямого праймера, фланкированного на 5` конце последовательностью промотора полимеразы фага T7. ПЦР-продукт был клонирован в TA-вектор pCR2.1 с последующей трансформацией клеток *E. coli* штамма TOP10. Из бактериальных клонов была выделена и очищена плазмидная ДНК с дальнейшим секвенированием по Сэнгеру. Для синтеза РНК *in vitro* плазмидная ДНК была предварительно обработана рестриктазой EcoR1, после чего проводили дополнительную очистку в геле клонируемого фрагмента. Далее провели синтез РНК при помощи высокопроцессивной РНК-полимеразы фага T7. *In vitro* РНК дополнительно переосадили кислым фенолом. Очищенную РНК обработали пиррофосфогидролазой и экзонуклеазой XRN1. Обработанные и необработанные образцы анализировали с помощью полиакриламидного геля в денатурирующих условиях.

В результате мы наблюдали неполный гидролиз 3` концов РНК только у 1 и 4 сегментов вируса Алонгшан, в то время как у 2 и 3 сегментов произошла полная деградация РНК.

Полученные нами данные впервые в мире продемонстрировали наличие субгеномных РНК у представителей семейства *Flaviviridae* с сегментированным геномом позитивной полярности, а также различия сегментов по устойчивости к экзорибонуклеазе XRN1.

Литература

1. Kholodilov I. S. et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia // *Viruses*. 2021. V. 13 (3). P. 458.
2. Litov A. G. et al. Conserved Sequences in the 5' and 3' Untranslated Regions of Jingmenvirus Group Representatives // *Viruses*. 2023. V. 15 (4). P. 971.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-259

**ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ
НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ****ANTIVIRAL PROPERTIES OF EXTRACTS OF BASIDIOMYCETES OF THE NOVOSIBIRSK REGION**М. А. Проценко¹, Е. И. Филиппова¹, Е. В. Макаревич¹, И. А. Горбунова², Т. В. Теплякова¹, Н. А. Мазуркова¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово²Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, НовосибирскM. A. Protsenko¹, E. I. Filippova¹, E. V. Makarevich¹, I. A. Gorbunova², T. V. Tepliyakova¹, N. A. Mazurkova¹¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo²Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk

✉ protsenko_ma@vector.nsc.ru

Аннотация

Получены и охарактеризованы по химическому составу сухие этанольные и водные экстракты из плодовых тел и культивируемого мицелия базидиомицетов. Отмечено, что экстракты *in vitro* проявляют активность в отношении вируса гриппа А, вируса простого герпеса 2-го типа, вируса осповакцины и вируса оспы мышей. Исследована противовирусная активность *in vivo* экстракта мицелия *Fomes fomentarius* в отношении вируса гриппа субтипа H3N2.

Abstract

Dry ethanolic and aqueous extracts from fruiting bodies and cultivated mycelium of basidiomycetes were obtained and investigated for chemical composition. *In vitro* extracts are active against influenza virus A, herpes simplex virus type 2, vaccinia virus and mouse poxvirus. The *in vivo* antiviral activity of *Fomes fomentarius* mycelium extract against influenza virus subtype H3N2 was studied.

В настоящее время учеными всего мира активно проводятся исследования по поиску и созданию новых противовирусных препаратов на основе соединений природного происхождения. Это связано с тем, что препараты на основе источников природного происхождения обладают высокой биологической активностью и низкой токсичностью при минимуме побочных эффектов. В этом отношении базидиомицеты представляют значительный интерес в качестве источников лечебных и профилактических средств с противоопухолевой, иммуностимулирующей и противовирусной активностью [1].

В Новосибирской области произрастает широкий спектр базидиальных грибов, однако следует отметить, что лишь незначительная их доля в настоящее время используется в качестве сырья для получения лекарственных препаратов.

Объектами исследования служили плодовые тела базидиомицетов *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Coprinus comatus* (O. F. Mull.) Pers., *Amanita muscaria* (L.) Hook., собранных в окрестностях г. Новосибирска, Новосибирской области, а также культивируемый погруженным способом мицелий *Fomes fomentarius* штамм Кр-112, депонированный в Коллекции вирусов, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под номером F-1261.

Для выращивания в условиях чистой культуры использовали различные питательные среды с компонентами: глюкоза, пептон, крахмал, кукурузный экстракт, меласса и минеральные соли. Культивирование проводили на круговых качалках при скорости вращения 190 об/мин, при температуре 26±2 °С, инкубируя в течение 7 суток, используя в качестве посевного материала инокулят глубинной культуры в объеме 20 % [2, 3].

Из высушенного грибного сырья получали сухие спиртовые и водные экстракты по разработанной нами ранее технологии [1]. Содержание белка в образцах определяли методом Бредфорд, полисахариды анализировали методом Дрейвуда в модификации, флавоноидов по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия [2].

Для тестирования токсичности и противовирусной активности грибных экстрактов использовали перевиваемые культуры клеток: почки собаки кокер-спаниеля (MDCK) и почки взрослой африканской зеленой мартышки (Vero) [4].

В работе использовали штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2); штамм вируса простого герпеса 2-го типа (MS), штамм вируса осповакцины

(Л-ИВП) и штамм вируса оспы мышей (К-1) полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Выявлено, что этанольные экстракты лесного плодового тела *Amanita muscaria* и культивируемого мицелия *Fomes fomentarius* показали активность в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK.

Показано, что водный экстракт гриба *Coprinus comatus* и этанольные экстракты *Lycoperdon pyriforme* и *Phallus impudicus* обладали активностью в отношении вируса оспы мышей, вируса осповакцины и вируса простого герпеса 2-го типа в культуре клеток Vero. В отношении вируса простого герпеса 2-го типа активность проявляли и этанольные экстракты мицелия *Fomes fomentarius*.

В опытах *in vivo* при пероральном введении этанольного экстракта мицелия *Fomes fomentarius* мышам, инфицированным вирусом гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), в профилактической схеме выживаемость мышей составила 80 %, а средняя продолжительность жизни — $14,8 \pm 2,5$ суток, что отличалось от контрольных показателей (при $p \leq 0,05$). В контрольной группе животных (без введения препаратов выживаемость и средняя продолжительность жизни мышей составили 20 % и $10,5 \pm 3,7$ суток соответственно.

Таким образом, результаты исследований показывают, что экстракты базидиомицетов могут стать основой противовирусных препаратов для лечения широкого спектра вирусных инфекций.

Литература

1. Проценко М. А. Разработка технологии экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомицетов: дис. ... канд. биол. наук. Кольцово; 2016.
2. Проценко М. А., Костина Н. Е., Теплякова Т. В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer // Биотехнология. 2018. Т. 34. № 1. С. 45–51.
3. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре: Монография. К.: Наук. думка, 1988. 144 с.
4. Макаревич Е. В., Ибрагимова Ж. Б., Мазурков О. Ю., Филиппова Е. И., Горбунова И. А., Мазуркова Н. А. Химический состав и противовирусные свойства экстрактов плодовых тел гастероидных грибов Западной Сибири // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2017. № 80(5). С. 33–37.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-260

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ НОВОГО ШТАММА *DENDROLIMUS SIBIRICUS* ЦУПОВИРУС-1 В АЛЬТЕРНАТИВНОМ ХОЗЯИНЕ**METHOD FOR MOLECULAR DETECTION OF A NEW STRAIN OF *DENDROLIMUS SIBIRICUS* CYPOVIRUS-1 IN ALTERNATIVE HOST**А. О. Субботина^{1,2}, В. В. Мартемьянов¹, И. А. Белоусова¹¹Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университетA. O. Subbotina^{1,2}, V. V. Martemyanov¹, I. A. Belousova¹¹Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University

✉ subbotinaanya11@gmail.com

Аннотация

Биологические инсектициды признаны экологически безопасными для борьбы с насекомыми вредителями. Новый штамм *Dendrolimus sibiricus* Цуповирус-1 рассматривается как перспективный кандидат на роль биологического инсектицида. Альтернативный хозяин — *Manduca sexta* выбран в качестве вида для массового производства вируса. Новый молекулярный метод необходим для детекции накопления вируса в *M. sexta* в процессе массового производства.

Abstract

Biological insecticides are recognized as more environmentally friendly for insect pest control. A new strain of *Dendrolimus sibiricus* Cyovirus-1 is considered as a candidate for mass production of biological pest control agents. An alternative host — *Manduca sexta* was chosen as a suitable species for further cultivation and production of a DsCPV-1 strain. New molecular method needed to detect viral accumulation in *M. sexta* during mass production.

Новый штамм *Dendrolimus sibiricus* Цуповирус-1 (*DsCPV-1*) был недавно выделен из гусениц сибирского шелкопряда *D. Sibiricus* [1]. *DsCPV-1* принадлежит к роду Цуповирус семейства Reoviridae. Циповирусы в основном заражают представителей чешуекрылых [2] и иногда двукрылых [3]. Геном состоит из 10 линейных сегментов ДЦРНК общей длиной 24,7 т.п.н. [1]. У данного штамма есть ряд преимуществ перед уже существующими биоинсектицидами. Он обладает как горизонтальной (контаминация через экскременты), так и вертикальной передачей и этим превосходит бактериальные биоинсектициды. Также он оказывает патогенное воздействие на широкий круг чешуекрылых, поэтому превосходит самые популярные на данный момент бакуловирусные биоинсектициды. Его вирулентность сопоставима с вирулентностью других энтомопатогенов, поэтому данный штамм может рассматриваться как перспективный кандидат в качестве нового биоинсектицида [1]. Данный вирус способен формировать тела-включения (полиэдры), которые имеют достаточно большие размеры и могут быть визуализированы в световой микроскоп [2].

Для культивирования и массового производства нового штамма *in vivo* подобран наиболее подходящий вид хозяина — табачный бражник *Manduca sexta* (альтернативный хозяин). Было показано, что заражение *DsCPV-1* инициирует патогенез у *M. sexta* и инфицированный материал сохраняет свои патогенные свойства [1]. Однако при пассаже через альтернативного хозяина наблюдается снижение количества и размера полиэдров. Поэтому необходимо показать с помощью молекулярных методов наличие вирусной репликации в альтернативном хозяине — табачном бражнике. Также данный молекулярный метод будет необходим для детекции накопления вируса в альтернативном хозяине в процессе массового производства биопрепарата.

В данной работе мы разработали тест-систему, в основе которой лежит ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией, которая способна детектировать относительное количество ДЦРНК *DsCPV-1* в ткани среднего кишечника *M. sexta*. Мы выбрали две пары праймеров для двух участков РНК *DsCPV-1*: для некодирующего участка гена полиэдрина и для некодирующего участка гена полимеразы. Для нормировки копий РНК циповируса на РНК бражника мы использовали праймеры на ген рибосомного белка S3 *M. sexta* 40S субъединицы [4].

Мы показали, что репликация вирусной дцРНК в ткани среднего кишечника *M. sexta* увеличивается в течение инфекции, а значит данный альтернативный хозяин может использоваться для массового производства вирусного биоинсектицида на основе *DsCPV-1*.

Разработанная и протестированная нами методика молекулярной детекции нового штамма *DsCPV-1* в альтернативном хозяине может быть полезна для: определения динамики увеличения количества *DsCPV-1* в *M. sexta* при культивировании вируса, детекции наличия скрытой инфекции (высокая чувствительность количественной ПЦР по сравнению со стандартной ПЦР), изучения механизмов патологических процессов *DsCPV-1* с целью улучшения патологических свойств штамма.

Литература

1. Martemyanov V.V. et al. A New Cypovirus-1 Strain as a Promising Agent for Lepidopteran Pest Control // *Microbiology Spectrum*. 2023. С. e03855-22.
2. Belloncik S., Mori H. Cypoviruses // *The insect viruses*. 1998. С. 337–369.
3. Shapiro A. et al. Morphological and molecular characterization of a Cypovirus (Reoviridae) from the mosquito *Uranotaenia sapphirina* (Diptera: Culicidae) // *Journal of virology*. 2005. Т. 79. №. 15. С. 9430–9438.
4. Rao X. J. et al. Characterization of a novel *Manduca sexta* beta-1, 3-glucan recognition protein (β GRP3) with multiple functions // *Insect biochemistry and molecular biology*. 2014. Т. 52. С. 13–22.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-261

**ОСНОВНЫЕ ФИТОПАТОГЕННЫЕ ВИРУСЫ КАРТОФЕЛЯ,
РАСПРОСТРАНЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ****THE MAIN PHYTOPATHOGENIC POTATO VIRUSES
DISTRIBUTED IN THE NOVOSIBIRSK REGION**К. А. Табанюхов¹, В. С. Масленникова^{1,2}, Е. В. Бедарева^{1,2}, М. Б. Пыхтина¹¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный аграрный университетК. А. Tabanyukhov¹, V. S. Maslennikova^{1,2}, E. V. Bedareva^{1,2}, M. B. Pykhtina¹¹Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State Agrarian University

✉ tabanyuhov93@mail.ru

Аннотация

В результате проведенного мониторинга выявлена высокая частота встречаемости в районах области четырех вирусов картофеля — PVY, PVM, PVX и PVS. Вириод веретеновидности клубней картофеля полностью отсутствовал у всех протестированных образцов. Частота встречаемости разных вирусов у растений картофеля составила: PVY — 84,2 %; PVX — 13,2 %; PVM — 60,5 %, PVS — 28,9 %; PVA, PLRV — 0 %.

Abstract

As a result of the monitoring, a high frequency of occurrence in the districts of the region of four potato viruses — PVY, PVM, PVX and PVS was revealed. Potato spindle tuber viroid was completely absent in all tested samples. The frequency of occurrence of different viruses in potato plants was: PVY — 84.2 %; PVX — 13.2 %; PVM — 60.5 %, PVS — 28.9 %; PVA, PLRV — 0 %.

В настоящее время на картофеле идентифицировано в различных странах и регионах с разнообразными природно-климатическими условиями около 40 фитопатогенных вирусов. Наиболее важными из них, получившими практически повсеместное распространение везде, где возделывается картофель, являются вирус скручивания листьев картофеля (БСЛК, potato leaf roll virus, PLRV), Y-вирус картофеля (YBK, potato virus Y, PVY), X-вирус картофеля (ХБК, potato virus X, PVX), S-вирус картофеля (SBK, potato virus S, PVS), M-вирус картофеля (МБК, potato virus M, PVM) [1]. Каждый из этих патогенов способен привести к потере от 10 до 60 % урожая, а при смешанной вирусной инфекции потери могут быть еще выше [2].

Исследования были выполнены в 2023 г. на базе лаборатории исследования вирусных заболеваний растений и животных ФИЦ ФТМ и лаборатории биологической защиты растений и биотехнологии НГАУ. Сбор образцов проводили специалисты ФГБУ «Россельхозцентр» по Новосибирской области. Выделение вирусной РНК из собранных листьев картофеля проводили с использованием набора «ФитоСорб» производства научно-производственной компании «СИНТОЛ» (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ РНК проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Наличие вирусов в образцах листьев картофеля определяли с использованием набора реагентов (НПК «СИНТОЛ») PV-005 (PVX, PVY, PVM, PLRV, PVA, PVS и PSTVd). Изучены 128 растений раннеспелых и среднеранних сортов картофеля из Искитимского, Коченевского и Новосибирского районов Новосибирской области.

Максимальная частота встречаемости в районах области была отмечена для четырех вирусов — PVY, PVM, PVX и PVS. Наиболее высокий уровень инфицирования картофеля был выявлен в Искитимском районе, где были широко представлены в вирусы Y и M (распространенность до 90 %). PVS встречался в Искитимском и Новосибирском районах (40–60 %). Наибольшее накопление вирусной инфекции наблюдали в образцах клубней раннеспелых сортов, при этом на ранних сортах распространены были вирусы PVY и PVS. Среднеранние сорта чаще, чем раннеспелые, были поражены PVM. Вириод веретеновидностей клубней картофеля (карантинный объект) полностью отсутствовал у всех протестированных образцов.

Смешанные вирусные инфекции составили заметную долю образцов. встречаемость комбинации инфекции PVS + PVM в растениях составляла 34,2 %, PVY + PVS — 47,4 %, PVS + PVM + PVY — 9,2 %.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой вирусной нагрузке семенного фонда картофеля, что указывает на необходимость проведения дальнейшего мониторинга вирусных заболеваний.

Литература

1. Анисимов Б. В. Вирусные болезни и их контроль в семеноводстве картофеля // Защита и карантин растений. 2010. № 5. С. 12–18.
2. Павлова Е. А. Диагностика скрытой вирусной инфекции картофеля — важный этап семеноводства // Защита и карантин растений. 2014. № 2. С. 15–16.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-262

МИНИГЕНОМНЫЕ И ПСЕВДОТИПИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**MINIGENOMIC AND PSEUDOTYPED SYSTEMS FOR SCREENING COMPOUNDS WITH ANTIVIRAL ACTIVITY**А. Е. Тишин¹, О. И. Яровая², С. С. Ефстифеева¹, А. Р. Иматдинов¹, И. Р. Иматдинов¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАНA. E. Tishin¹, O. I. Yarovaya², S. S. Efstifeeva¹, A. R. Imatdinov¹, I. R. Imatdinov¹¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo²N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS

✉ tishin_ae@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе описаны подходы и генетические конструкции, применяемые для высокопроизводительных скрининговых исследований органических соединений, проявляющих ингибирующую активность в отношении репликационно-транскрипционной машинерии вируса Пуумала.

Abstract

This research describes approaches and genetic constructs used for high-performance screening studies of organic compounds exhibiting inhibitory activity against the replication-transcription machinery of the Puumala virus.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая хантавирусами Старого Света, является наиболее распространенным природно-очаговым заболеванием в РФ. За период 2000–2022 гг. подтверждено более 164 тыс. случаев заболевания ГЛПС, зарегистрированных в 69 субъектах РФ. При этом подавляющее большинство случаев ГЛПС (97,7 %) вызвано вирусом Пуумала (PUUV) [1].

В настоящее время нет зарегистрированных вакцин или средств специфической терапии против ГЛПС, вызванной PUUV. Инактивированная вакцина, используемая в КНР и Южной Корее, основана на хантавирусах Хантаан и Сеул и не способна обеспечить защиту от вирусной инфекции, вызванной PUUV, поэтому не подходит для вакцинации европейской части населения в РФ [1]. Однако в настоящее время клеточная комбинированная инактивированная вакцина против ГЛПС на основе вирусов Пуумала и Хантаан проходит доклинические испытания в РФ [2]. Таким образом, для обеспечения биологической безопасности населения РФ требуется как разработка вакцинных препаратов, так и средств специфической терапии, что осложняется биологическими свойствами возбудителя (труднокультивируемый хантавирус с длительным циклом репродукции в перmissive клеточных линиях). Разработка и внедрение технологий обратной генетики для моделирования транскрипционно-репликационной машинерии и вирус-клеточных взаимодействий хантавируса PUUV позволит обезопасить, снизить стоимость и ускорить скрининговые исследования органических соединений, обладающих противовирусной активностью.

В рамках данной работы представлены результаты планомерной модификации репортерных минигеномных систем, подходов по псевдотипированию гликопротеинами PUUV репликационно-дефектных вирусов, также протоколов их использования в скрининговых исследованиях.

Вирионы вируса Пуумала имеют сферическую форму и содержат 3 сегмента (L, M и S) одноцепочечной РНК отрицательной полярности. L-сегмент кодирует вирусную РНК-полимеразу L и совместно с продуктом S-сегмента — нуклеопротеином N — является минимальным компонентом функциональной белковой машинерии транскрипции/репликации вируса Пуумала. M-сегмент кодирует полипротеин, процессирующийся клеточными протеазами до структурных гликопротеинов Gn и Gc, участвующих во взаимодействии с клеточными рецепторами и проникновении вируса в клетку.

Ранее нами разработана репортерная минигеномная система вируса Пуумала, представляющая собой три генетические конструкции: две кодируют вирусные белки L и N (хелперные конструкции), и одна — репортерная плаزمиды, обеспечивающая экспрессию неэкспонированной неполиаденированной РНК с 5'- и 3'-концами, аутентичные S-сегменту генома PUUV [3]. В антисмысловой ориентации транскрипта репортерной плазмиды закодиро-

вана открытая рамка считывания красного флуоресцентного белка DsRed-Express2. При трансфекции эукариотических клеток компонентами минигеномной системы синтезируются вирусные белки L и N, которые распознают 5'- и 3'-NCR синтетического транскрипта, инкапсидируют его, после чего с рибонуклеопротеинового комплекса полимеразой L транскрибируется мРНК (+)-полярности. Таким образом, продукция репортера возможна только при синтезе и корректном функционировании всех компонентов. Детекция репортера возможна методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, что усложняет параллельные исследования.

Для упрощения детекции функциональной активности минигеномной системы вируса Пуумала в текущем году получено следующее поколение модифицированных минигеномов, кодирующих ген SEAP. SEAP — термостабильная секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза, активность которой дает возможность детектировать с использованием широкого круга доступных хромогенных и флуоресцентных субстратов. Данный подход существенно повышает производительность параллельных скрининговых исследований с применением доступных планшетных ридеров.

Для скрининга соединений, ингибирующих связывание и/или слияние гликопротеинов Gn и Gc с компонентами клеток, разработан подход псевдотипирования репликационно-дефектного вируса rVSV_dG_mNeonGreen при инфицировании клеток, в которых экспрессируется модифицированный GPC вируса Пуумала.

С использованием разработанных минигеномных систем вируса Пуумала проведен параллельный скрининг 37 органических соединений, два из которых обладают потенциальной ингибирующей активностью в отношении репликационно-транскрипционной машинерии вируса Пуумала, а для семи показана позитивная тенденция, заключающаяся в снижении сигнала репортера в среднем на 30 % относительно контролей.

Литература

1. Tkachenko E. et al. Cases of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Russia during 2000–2022 // *Viruses*. 2023. Т. 15. №. 7. С. 1537.
2. Dzagurova T.K. et al. Pre-clinical studies of inactivated polyvalent HFRS vaccine // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020. Т. 10. С. 545372.
3. Пат. 22783430С1 Российская Федерация / Тишин А. Е.; Минигеномная система вируса Пуумала для оценки противовирусной активности ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы // Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»; заявл. 16.03.22; опубл. 14.11.22.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-263

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1-АМИНО-7,7-ДИМЕТИЛБИЦИКЛО[2.2.1]ГЕПТАН-2-ОНА
И 1,7,7-ТРИМЕТИЛБИЦИКЛО[2.2.1]ГЕПТАН-2-АМИНА В КАЧЕСТВЕ
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОРТОПОКСВИРУСОВ

SYNTHESIS OF 1-AMINO-7,7-DIMETHYLBICYCLO[2.2.1]HEPTAN-2-ONE
AND 1,7,7-TRIMETHYLBICYCLO[2.2.1]HEPTAN-2-AMINE DERIVATIVES
AS POTENTIAL INHIBITORS OF ORTHOPOXVIRUSES

С. А. Тищенко^{1,2}, А. С. Соколова², Н. Ф. Салахутдинов², Л. Н. Шишкина⁵¹Новосибирский государственный университет²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. КольцовоS. A. Tishchenko^{1,2}, A. S. Sokolova², N. F. Salakhutdinov², L. N. Shishkina⁵¹Novosibirsk State University²N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS³State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ s.tishchenko@g.nsu.ru

Аннотация

Были синтезированы новые потенциальные агенты против ортопоксвирусов, которые были проверены на их вирусингибирующий эффект в отношении вируса осповакцин.

Abstract

New potential agents against orthopoxviruses were synthesized, which were tested for their virus-inhibiting effect against the smallpox vaccine virus.

В связи с прекращением во всем мире вакцинации против оспы в 1980 г., население все чаще становится восприимчивыми к ортопоксвирусам, что приводит к увеличению заражения людей зоонозными вирусами, включая вирус оспы обезьян, вирус оспы верблюдов, передаваемые от животных к человеку и представляющие биологическую угрозу. Вспышка заболеваемости вирусом оспы обезьян весной 2022 г. подчеркивает актуальность в разработке новых противовирусных агентов в отношении ортопоксвирусов. Ранее нами было показано, что соединения, включающие 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептановый фрагмент, демонстрируют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов [1]. В этой работе наше внимание было сфокусировано на синтезе новых соединений

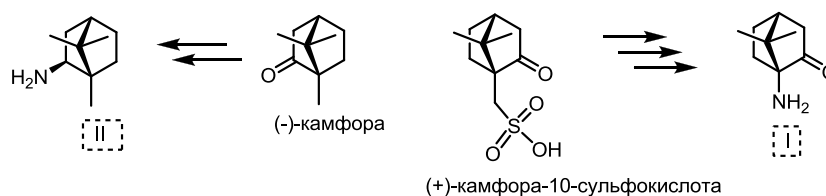


Рис. 1. Синтез аминов I и II

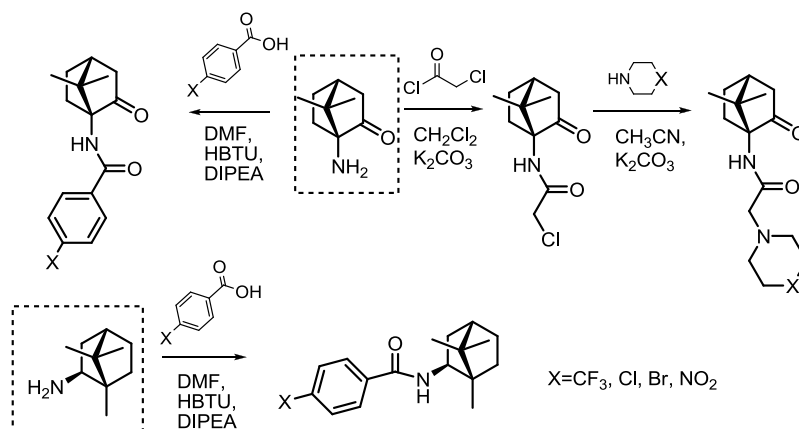


Рис. 2. Синтез производных аминов I и II

со структурой такого же типа. В качестве исходного соединения был выбран 1-амино-7,7-диметилбицикло[2.2.1]гептан-2-он (**I**) и 1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-амин (**II**). Синтез амина **I** осуществлялся из коммерчески доступного реагента (+)-камфора-10-сульфоокислота. Синтез амина **II** осуществлен из (-)-камфоры.

Далее синтезированные амины **I** и **II** участвовали в превращениях по двум разным направлениям.

Среди полученных производных бициклических монотерпеноидов обнаружены агенты со значительным вирусингибирующим эффектом в отношении вируса осповакцины.

Литература

1. Sokolova A. S. et al, *ChemMedChem*. **2022**, *17*, e202100771.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-264

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕХИНОВ И ЛЕЙКОАНТОЦИАНОВ
ALCHEMILLA VULGARIS L. В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*****THE RESEARCH OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF *ALCHEMILLA VULGARIS* L. CATECHINS
AND LEUCOANTHOCYANINS *IN VIVO* EXPERIMENTS**Е. И. Филиппова¹, Н. А. Мазуркова¹, Т. А. Кукушкина²¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово²Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, НовосибирскE. I. Filippova¹, N. A. Mazurkova¹, T. A. Kukushkina²¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo²Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk

✉ filippova_ei@vector.nsc.ru

Аннотация

Изучена противовирусная активность экспериментального препарата на основе катехинов и лейкоантоцианов манжетки обыкновенной в экспериментах на аутбредных мышах ICR в отношении вируса гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1. Против этих субтипов рассчитаны 50%-е эффективные дозы препарата манжетки, составляющие 14,1 и 31,6 мкг/г массы мыши соответственно. Выявлено, что образец в дозе 25 мкг/г массы защищает мышей от гибели на 60 и 64 % по сравнению с контролем соответствующего вируса.

Abstract

The antiviral activity of the experimental preparation based on catechins and leucoanthocyanins of *Alchemilla vulgaris* was studied in experiments on outbred ICR mice against influenza A/H3N2 and A/H5N1 viruses. 50 % effective doses of the *Alchemilla vulgaris* preparation against these subtypes were calculated, amounting 14.1 and 31.6 µg/g of mouse weight, respectively. It was found that the sample in dose 25 µg/g of weight protects mice from death by 60 and 64 % compared to the corresponding virus control.

В настоящее время медицина располагает сравнительно небольшим количеством средств специфической противовирусной терапии. Многие из применяемых в практике здравоохранения противовирусных препаратов имеют ряд существенных недостатков, среди них такие, как высокая токсичность, низкая биодоступность, быстрое развитие устойчивости штаммов вирусов к препаратам [1, 2]. Все это обуславливает необходимость создания более эффективных противовирусных препаратов, в том числе и на основе биологически активных веществ природного происхождения.

Для оценки противовирусной активности исследуемых образцов мы использовали штаммы вируса гриппа (ВГ) птиц А/chicken/Kurgan/05/2005 (Н5N1) и человека А/Aichi/2/68 (Н3N2), полученные из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор».

В работе был использован образец на основе суммы флавоноидов из подземных частей манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), собранной на территории Горного Алтая. Препарат был получен в лаборатории фитохимии ЦСБС СО РАН и представлял собой сухой экстракт, состоящий из 70 % катехинов и лейкоантоцианов, полученный из корней растения путем извлечения 50-кратным объемом этилацетата, как описано в [3]. В качестве референс-препарата в экспериментах использовали Тамифлю (Ф. Хоффманн — Ля Рош Лтд., Швейцария).

Аутбредные мыши ICR массой 14–16 г получены из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». Мышам перорально вводили экстракт по лечебно-профилактической схеме в суточной дозе 25 мкг/г массы мыши, а Тамифлю — 10 мкг/г массы. Сравнение доли выживших мышей в инфицированных группах при введении экстрактов и контроле проводили по критерию χ^2 , а СПЖ животных — по U-критерию Манна — Уитни.

Для определения 50%-й эффективной дозы ($ЭД_{50}$) препарата в отношении 2-х штаммов ВГ была приготовлена серия двукратных разведений препарата с концентрациями от 15,0 до 0,117 мг/мл. Препарат вводили перорально 6 мышам по 200 мкл/мышь до и после инфицирования ВГ и затем в течение последующих 4 сут два раза в день в суммарной суточной дозе 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,125 мкг/г массы мыши. Учет гибели мышей проводили в течение 16 сут после инфицирования животных. Затем по методу Спирмена — Кербера были рассчитаны $ЭД_{50}$ препарата [4] в отношении двух штаммов ВГ.

Показано, что ЭД₅₀ экспериментального образца в отношении ВГ А/Н3N2 и А/Н5N1 составили 14,125 (7,943÷25,119) и 31,62 (18,20÷54,95) мкг/г массы мыши соответственно.

В инфицированных контрольных группах мышей и получавших Тамифлю при заражении ВГ А/Н3N2 выжило 20 и 100 %, а при заражении А/Н5N1 — 0 и 64 %. В результате изучения протективных свойств препарата в отношении ВГ на лабораторных мышах установлено, что пероральное введение животным образца защищало 60 % животных от ВГ А/Н3N2 и 64 % от ВГ А/Н5N1 (см. таблицу).

**Противовирусная активность катехинов и лейкоантоцианов манжетки обыкновенной
в отношении ВГ в опытах на мышах**

Группы мышей, получавших препараты	Показатели выживаемости мышей при инфицировании ВГ в дозе 10 ЛД ₅₀		
	Количество и % павших мышей	КЗ (в %)	СПЖ (сут) М±S _М
A/Aichi/2/68 (H3N2)			
Образец, n = 10	2 (20 %) **	60	14,2±4,1*
Тамифлю, n = 10	0 (0 %) **	80	16,0±0,0*
Контроль (без препарата), n = 10	8 (80 %)	-	7,3±4,7
A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)			
Образец, n = 11	4 (36 %) **	64	12,6±4,8*
Тамифлю, n = 11	4 (36 %) **	64	12,7±4,6*
Контроль (без препарата), n = 11	11 (100 %)	-	7,0±3,2

Примечания: М — среднее значение, S_М — стандартное отклонение; КЗ (коэффициент защиты) = % гибели животных в контроле — % гибели животных в опыте; СПЖ — средняя продолжительность жизни (за максимальный срок жизни животных принимали 16 сут, т. е. эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели инфицированных ВГ мышей); n — число животных в группах; ** — отличие от при p<0,05.

Полученные результаты указывают на перспективность создания противогриппозного препарата на основе катехинов и лейкоантоцианов манжетки обыкновенной.

Литература

1. Галегов Г. А., Андропова В. Л., Колобухина Л. В., Львов Н. Д. Специфическая лекарственная терапия распространенных и социально значимых вирусных инфекций человека // Вопросы вирусологии. 2012. № 1. С. 180–189.
2. Liu G., Xiong S., Xiang Y., Guo C., Chong-Ren F., Zhang Y. Y., Wang Y., Kitazato K. Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus // Arch Virol. 2011. V. 156. P. 1359–1369.
3. А.с. 1073966 (СССР). Способ получения Р-витаминного препарата / Г. Р. Азовцев, Е. Г. Изюмов, А. А. Зыков — 1983.
4. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. М.: Медицина, 2005. 832 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-265

**ВИРУСЫ ГРАНУЛЕЗА ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ
ИЗ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ФГБНУ ФНЦБЗР,
ОБЛАДАЮЩИЕ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ***

**VIRUSES OF GRANULOSIS OF THE APPLE MOTH FROM THE BIORESOURCE COLLECTION
OF THE FSBSI FRCBPP WITH INSECTICIDAL ACTIVITY**

А. А. Цыгичко

Федеральный научный центр биологической защиты растений, Краснодар

A. A. Tsygichko

Federal Research Center of Biological Plant Protection, Krasnodar

✉ 23612361@inbox.ru

Аннотация

В работе представлены результаты лабораторных исследований энтомопатогенной активности 18 штаммов вируса гранулеза яблонной плодовой жоржки из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР в отношении гусениц природной популяции *Cydia pomonella*. Среди них выделены наиболее эффективные — BZR GV 11 и BZR GV L-3 с уровнем энтомопатогенной активности на 10-е сутки эксперимента — 90,3–100,0 %.

Abstract

The entomopathogenic activity of the 18 apple codling moth granulosis virus strains from the bioresource collection of the Federal Research Center of Biological Plant Protection «State Collection of Entomoacariphages and Microorganisms» against *Cydia pomonella* caterpillars was assessed *in vitro*. The most effective strains of the apple moth granulosa virus (BZR GV 11 and BZR GV L-3) were revealed, the level of entomopathogenic activity of which was 90,3–100 % on the 10th day of the experiment.

В природных экосистемах процесс контроля численности живых организмов осуществляется в числе прочего посредством вспышек эпизоотий. В популяциях насекомых причиной эпизоотий могут выступать бакуловирусы, вызывая массовые вспышки вирозов в популяциях вредителей [1].

Бакуловирусы — это группа облигатных внутриклеточных паразитов. Они высокоэффективны при использовании их против фитофагов-вредителей. В мировой практике аграрии активно используют вирусы полиэдроза или гранулеза как действующее вещество биоинсектицидов [2, 3]. Например, основным действующим веществом препарата «Карповирусин, СК» (CpGV isolat M, $1,0 \times 10^{15}$ гранул/л, «Arysta LifeScience Corporation», Франция), используемого против яблонной плодовой жоржки *Cydia pomonella* L., 1758, является мексиканский штамм вируса гранулеза яблонной плодовой жоржки [4].

При корректном применении эффективность вирусных инсектицидов может достигать 97 %. Однако список доступных вирусных пестицидов в РФ ограничен всего двумя препаратами иностранного производства [4, 5]. Именно поэтому существует необходимость в разработке отечественных высокоэффективных и узконаправленных вирусных биоинсектицидов.

Целью настоящего исследования является изучение инсектицидных свойств новых штаммов вируса гранулеза яблонной плодовой жоржки в отношении целевого насекомого.

Объектами исследования являлись 18 штаммов вируса гранулеза яблонной плодовой жоржки из биоресурсной коллекции «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» (БРК ФГБНУ ФНЦБЗР). В ходе исследования брали гусениц природной популяции *C. pomonella* 2–5 возраста. Вирусные суспензии готовили по стандартным методикам работы с бакуловирусами насекомых [6], титр которых составил от $8,0 \times 10^6$ до $1,3 \times 10^8$ гранул/мл. В качестве биологического эталона брали «Мадекс Твин, СК». 15 насекомых в трехкратной повторности на вариант инокулировали перорально с использованием искусственной питательной среды. Учет гибели проводили на 3, 5, 10 сутки после обработки. Обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 10. Инсектицидную активность штаммов оценивали по критерию биологической эффективности (БЭ) Хендерсона — Тилтона [6].

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-16-00260.

© А. А. Цыгичко, 2023

Установлено, что БЭ на 3–5 сутки у исследуемых штаммов варьировала от 0 % до 64,2 %. БЭ эталона составила 50,2–53,3 %, что говорит о его высокой инсектицидной активности в первые сутки наблюдений. Стоит выделить штамм BZR GV L-8, БЭ которого на 5 сутки эксперимента составила 64,2 %, что на 9,1 % больше, чем при применении препарата «Мадекс Твин, СК».

Выявлено, что БЭ на 10 сутки в варианте с применением эталона составила 67,7 %, что соответствует заявленному уровню. БЭ исследуемых штаммов варьировала от 51,6 % до 100 %, активность 15 исследуемых штаммов была выше, чем активность препарата «Мадекс Твин, СК».

Таким образом, выявлены наиболее эффективные штаммы вируса гранулеза яблонной плодовой гнили (BZR GV 1 и BZR GV L-8), энтомопатогенная активность которых в отношении *C. pomonella* на 10 сутки составила 90,3–100 % соответственно, что выше, чем при использовании биологического эталона.

Следует указать, что в данный момент все исследуемые штаммы проходят процедуру молекулярно-генетической идентификации в Институте цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Литература

1. Котти Б. К., Жильцова М. В. Значение блох (Siphonaptera) в природных очагах чумы // Паразитология. 2019. Т. 53, № 6. С. 506–517. DOI: 10.1134/S0031184719060061
2. Jehle J. A., Blissard G. W., Bonning B. C., Cory J. S., Herniou E. A., Rohrmann G. F., Theilmann D. A., Thiem S. M., Vlak J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision // Archives of Virology. 2006. 151(7). P. 1257–1266. DOI: 10.1007/s00705-006-0763-6
3. Бондарчук Е. Ю., Асатурова А. М., Томашевич Н. С., Цыгичко А. А., Гырнец Е. А. Биологический контроль численности яблонной плодовой гнили на основе энтомопатогенных микроорганизмов (обзор) // Достижения науки и техники АПК. 2020. Т. 34. № 11. С. 53–66. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-11108
4. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории РФ. Часть I. Пестициды. М.: МСХ РФ, 2023. 924 с.
5. Долженко Т. В., Долженко В. И. Инсектициды на основе энтомопатогенных вирусов // Агрохимия. 2017. № 4. С. 26–33.
6. Бондарчук Е. Ю., Цыгичко А. А., Асатурова А. М. Методические подходы к оценке энтомопатогенной активности микроорганизмов в отношении насекомых-вредителей *in vitro* (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 3 (27). С. 20–34. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-3-27-20-34

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-266

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В**HIGH THROUGHPUT DNA SEQUENCING OF HEPATITIS B VIRUS**М. Д. Чанышев¹, Н. В. Власенко¹, И. А. Котов², К. Ф. Хафизов¹, В. Г. Акимкин¹¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва²Московский физико-технический институт, ДолгопрудныйM. D. Chanyshev¹, N. V. Vlasenko¹, I. A. Kotov², K. F. Khafizov¹, V. G. Akimkin¹¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ chanish@mail.ru

Аннотация

В ряде исследований было показано, что генотип вируса гепатита В (ВГВ) и отдельные мутации влияют на течение заболевания. Существует необходимость в простом и надежном способе полногеномного секвенирования ВГВ. Нами была разработана амплификационная панель NGS для полногеномного секвенирования ВГВ. Панель была валидирована секвенированием по Сэнгеру. Секвенировано более 300 образцов ВГВ, определены генотипы и описанные в литературе мутации.

Abstract

It was shown that Hepatitis B Virus (HBV) genotype and individual mutations influence the course of the disease. There is a need for a simple and reliable method for sequencing the entire genome of hepatitis B virus. We have developed an NGS amplification panel for hepatitis B virus genome sequencing. The panel was validated using Sanger sequencing. More than 300 HBV samples were sequenced and genotypes and mutations described in the literature were identified.

В настоящее время вирусный гепатит В остается актуальной проблемой для здравоохранения как в Российской Федерации, так и во всем мире. Данные многочисленных исследований говорят о том, что генотип вируса может оказывать влияние на течение заболевания и его исходы, такие как цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК). Ряд мутаций в RT-домене Р-гена вируса гепатита В (ВГВ) ассоциирован с резистентностью к противовирусной терапии (ПВТ) аналогами нуклеозидов. Так, мутации rtL180M, rtA181T/V, rtT184G/S, rtS202G/I, rtM204I/V, rtN236T, rtM250V рассматриваются как связанные с резистентностью к ПВТ [1]. Ряд мутаций в S-гене ВГВ связан с ускользанием вируса от иммунного ответа при вакцинации. В исследованиях было показано, что аминокислотные замены sK141E/I/R и sG145A/R ассоциированы с резистентностью вируса к вакцине как *in vivo*, так и *in vitro* [2]. Мутации в X-гене ВГВ, в частности G1613A, C1653T, T1674C/G, T1753V и A1762T/G1764A, накапливаются при формировании ГЦК и могут служить дополнительными факторами риска [3]. При полногеномном секвенировании ВГВ в исследовании Belaiba и др. были определены мутации в генах S, C и X, которые могут быть связаны с развитием ЦП и ГЦК [4].

Для проведения углубленных исследований существует необходимость в простом и робастном способе полногеномного секвенирования ВГВ. В большинстве исследований амплифицируются фрагменты ДНК ВГВ длиной 1000–1500, которые далее секвенируются по Сэнгеру. Данный подход требует значительных временных затрат и ДНК ВГВ высокого качества. Применение высокопроизводительного секвенирования (NGS) имеет значительное преимущество перед секвенированием по Сэнгеру, поскольку позволяет получать вирусные геномы при низкой себестоимости и простоте протокола пробоподготовки.

Нами разработана амплификационная панель NGS для полногеномного секвенирования ВГВ. 54 праймера в мультиплексе, разбитые на два пула, амплифицируют фрагменты ДНК ВГВ длиной 180–300 пн, что позволяет секвенировать даже фрагментированные образцы. Праймеры снабжены адаптерными последовательностями Illumina, таким образом полученные ампликоны индексируются без этапа лигирования адаптеров. Индексированные ампликоны секвенируются на платформе Illumina. Для валидации панели ВГВ были выбраны 3 образца различных генотипов (А, В и D), фрагменты ДНК ВГВ были амплифицированы при помощи праймеров, не входящих в панель ВГВ, длина ампликонов составляла 829–1245 пн. Полученные ампликоны были секвенированы по Сэнгеру, а также при помощи Nextera XT DNA Library Preparation Kit. Результаты

секвенирования по Сэнгеру и при помощи Nextera полностью соответствуют последовательностям, полученным при помощи панели HBV.

Разработанная нами панель используется для полногеномного секвенирования ВГВ в ЦНИИЭ Роспотребнадзора в рамках программы «Санитарный щит». На момент написания тезисов секвенировано более 200 образцов ВГВ, полученные последовательности депонированы в российскую базу данных VGARus. Вирусная нагрузка в данных образцах составляла 10^3 – 10^7 МЕ/мл, при этом для образцов с низкой вирусной нагрузкой геном ВГВ был определен лишь частично, что тем не менее позволяет определить генотип вируса. Среди секвенированных образцов 16 % составлял генотип А, 2 % — генотип В, 82 % — генотип D. 8 образцов содержат хотя бы одну мутацию, связанную с резистентностью к ПВТ, 18 образцов — хотя бы одну мутацию, связанную с ускользанием от иммунного ответа.

Аналогов разработанной нами панели нет как в России, так и во всем мире. Панель HBV позволила поставить на поток полногеномное секвенирование ВГВ. Данный подход является важным направлением оптимизации и совершенствования системы эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями на территории РФ.

Литература

1. Araujo NM, Teles SA, Spitz N. Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region // *Front Microbiol.* 2020 V.11 P. 616023.
2. Mokaya J, Vasylyeva TI, Barnes E, Ansari MA, Pybus OG, Matthews PC. Global prevalence and phylogeny of hepatitis B virus (HBV) drug and vaccine resistance mutations // *J Viral Hepat.* 2021. V. 28(8) P. 1110–1120.
3. Xinyu Zhou, Donghong Liu, Zishuai Li, Jun Zhao, Shiliang Cai, Guangwen Cao The Mechanism of Hepatitis B Virus X Gene in Promoting Hepatocellular Carcinoma // *J Cancer Sci Clin Ther* 2022. V. 6(2) P. 222–233.
4. Belaiba Z, Ayouni K, et al. Whole genome analysis of hepatitis B virus before and during long-term therapy in chronic infected patients: Molecular characterization, impact on treatment and liver disease progression // *Front Microbiol.* 2022. V. 13 P. 1020147.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-267

МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 В СВЕРДЛОВСКОЙ И ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТЯХ

MONITORING OF THE SPREAD OF SARS-COV-2 VARIANTS IN THE SVERDLOVSK AND CHELYABINSK REGIONS

А. Е. Чернышева, И. А. Короткова,
Е. В. Болгарова, А. Ю. Маркарян

*Федеральный научно-исследовательский институт
вирусных инфекций «Вирум» Роспотребнадзора, Екатеринбург*

A. E. Chernysheva, I. A. Korotkova,
E. V. Bolgarova, A. Yu. Markaryan

Federal Scientific Research Institute of Viral Infections “Virom”, Ekaterinburg

✉ chernysheva_ae@niivirom.ru

Аннотация

В работе продемонстрированы результаты секвенирования образцов от больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19, наглядно показана динамика циркуляции вируса SARS-CoV-2 на территории Свердловской и Челябинской областей за 6 месяцев 2023 г.

Abstract

The paper demonstrates the results of sequencing samples from patients with a new coronavirus infection COVID-19, clearly shows the dynamics of the circulation of the SARS-CoV-2 virus in the Sverdlovsk and Chelyabinsk regions for 6 months of 2023.

Введение

Оmicron, зарегистрированный в ноябре 2021 г., постепенно эволюционировал и уже к началу 2022 г. имел пять различных линий BA.1, BA.2, BA.3, BA.4. и BA.5 [1]. В начале текущего года два новых рекомбинантных субварианта ХВВ и BQ быстро вытеснили ранее циркулировавшие варианты BA.2, BA.4 и BA.5. Мониторинг SARS-CoV-2 по настоящее время остается актуальным для назначения успешного лечения, а также для разработки новых вакцин и противовирусных препаратов.

Цель работы — анализ динамики и изучение особенностей геновариантов SARS-CoV-2, циркулирующих в Свердловской и Челябинской областях в период с января по июнь 2023 г.

Материалы и методы

Материалом исследования являлись мазки из носоглотки и ротоглотки, полученные от больных новой коронавирусной инфекцией. Вирусную РНК выделяли с помощью комплекта реагентов для выделения РНК «РИ-БО-преп» (AmpliSens, Россия). После проводили реакцию обратной транскрипции с использованием комплекта «Реверта — L» (AmpliSens, Россия) и амплификацию участков гена S. Продукты ПЦР разделяли в 1,5 % агарозном геле. Секвенирование фрагментов проводили по методу Сэнгера. Сборку полученных результатов осуществляли в программе UGENE. Множественное выравнивание осуществляли с использованием Python (версия 3.10.2). Филогенетический анализ проводили с помощью онлайн-ресурса Nextclade v.2 14.1.

Результаты

С помощью веб-инструмента было идентифицировано 7 различных клад: 21K (BA.1), 21L (BA.2), 22B (BA.5), 22D (BA.2.75), 22E (BQ.1), 22F (ХВВ), 23A (ХВВ.1.5). По полученным данным был построен график, который показывает динамику распределения геномного разнообразия по месяцам с января по июнь (рис. 1). По графику отчетливо прослеживается, что клада 22F и 23A превалировала с марта по июнь, что говорит о вытеснении других вариантов, преобладавших ранее на территории Свердловской и Челябинской областей, таких как: 22B (BA.5), 22L (BA.2), 22D (BA.2.75). Филогенетические деревья были построены относительно последовательности Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) (рис. 2) [2]. При анализе филогенетического дерева видно, что клада 22F

является рекомбинантным вариантом клады 22D (BA.2.75), в свою очередь клада 23A (XBB.1.5) родственной 22F (XBB). Множественное выравнивание секвенированных последовательностей показало, что Omicron 23A имеет те же мутации в S-гене, что и 27F, но с дополнительной мутацией F486P, которая увеличивает инфекционность из-за повышения аффинности связывания с ACE-2.

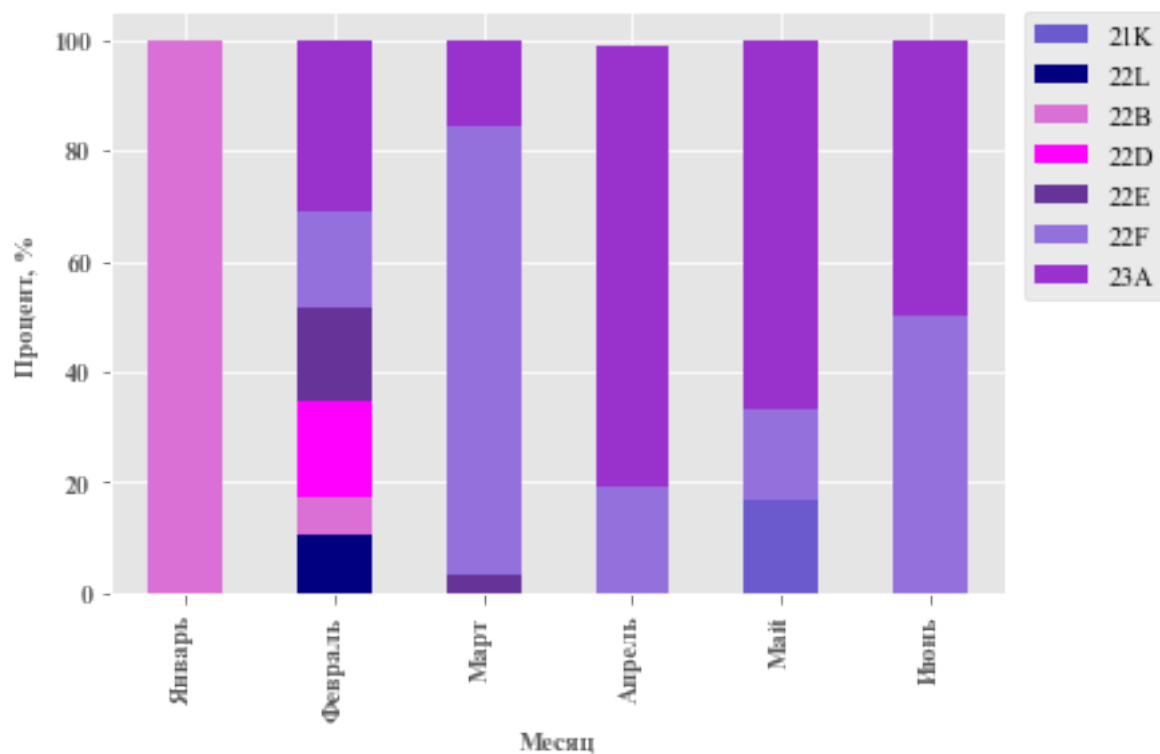


Рис. 1. Динамика геновариантов SARS-CoV-2 по месяцам

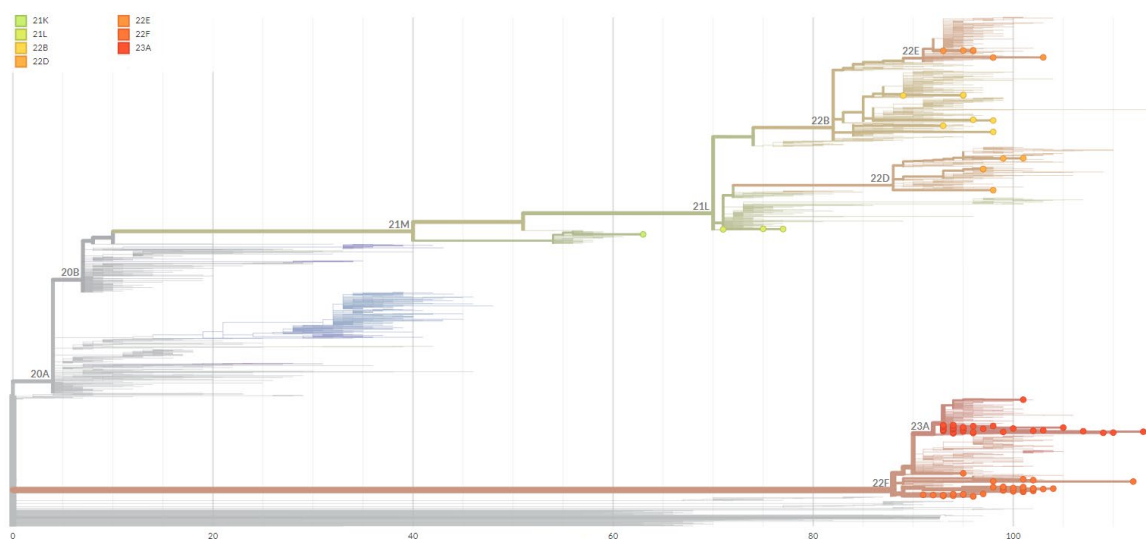


Рис. 2. Филогенетическое дерево геновариантов SARS-CoV-2

Вывод

Стремительное вытеснение ранее циркулировавших вариантов 22B (BA.5), 22L (BA.2), 22D (BA.2.75) может говорить о повышенной контагиозности новых мутировавших вариантов: 22E (BQ.1), 22F (XBB), 23A (XBB.1.5). Мутации в новых вариантах изменяют конформационные связи, что способствует сродству с рецептором ACE2 и уклонению от нейтрализации антител у лиц, ранее вакцинированных или переболевших. Таким об-

разом, анализ динамики и исследование изменчивости SARS-CoV-2 остается актуальным инструментом для совершенствования санитарно-эпидемиологического надзора за коронавирусной инфекцией и своевременного проведения профилактических мероприятий.

Литература

1. Petersen E., Ntoumi F., Hui D. S. et al. Emergence of new SARS-CoV-2 Variant of Concern Omicron (B.1.1.529) — highlights Africa's research capabilities, but exposes major knowledge gaps, inequities of vaccine distribution, inadequacies in global COVID-19 response and control efforts. *Int J Infect Dis.* 2022 Jan;114:268-272. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.11.040. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34863925; PMCID: PMC8634699.

2. Aksamentov I., Roemer C., Hodcroft E. B., Neher R. A. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal of Open Source Software.* 2021. № 6 (67). P. 3773. DOI: <https://doi.org/10.21105/joss.03773>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-268

**ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА *ATI* НА ПАТОГЕННЫЕ
И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ*****EFFECT OF THE *ATI* GENE DELETION ON PATHOGENICITY AND IMMUNOGENICITY
OF THE VACCINIA VIRUS**И. С. Шульгина, С. Н. Якубицкий, А. А. Сергеев, К. А. Титова,
М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Л. И. Карпенко, С. Н. Щелкунов*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*I. S. Shulgina, S. N. Yakubitskiy, A. A. Sergeev, K. A. Titova,
M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, L. I. Karpenko, S. N. Shchelkunov*State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo*

✉ yakubizkiy@vector.nsc.ru

Аннотация

Среди невирионных белков вируса осповакцины (ВОВ) в наибольшем количестве синтезируется белок массой 94 кДа, являющийся укороченной формой АТІ белка. Данный белок является мажорным иммуногеном при заражении ВОВ человека и животных, но при этом антитела против этого белка не являются вируснейтрализующими. В данной работе изучено, как продукция этого белка влияет на проявление свойств патогенности и иммуногенности ВОВ на модели мышей.

Abstract

Among nonvirion proteins of the vaccinia virus (VACV), a 94-kDa protein (a truncated form of АТІ protein) is synthesized in the largest quantity. This protein is a major immunogen upon infection of humans and animals with VACV. Meanwhile, antibodies specific to this protein are not virus-neutralizing. The present study aimed to investigate the effect of production of this protein on manifestation of pathogenicity and immunogenicity of VACV in a mouse model.

Ген *ati* вируса оспы коров (ВОВ) кодирует белок размером 150 кДа, который накапливается в инфицированных клетках в большом количестве на позднем этапе цикла репликации вируса и агрегирует с образованием в цитоплазме клеток гелеподобных тел — телец включения типа А (А-type inclusion, АТІ), в которые могут включаться зрелые вирионы. При этом антитела против этого белка не являются вируснейтрализующими. В случае вируса осповакцины (ВОВ) в большом количестве синтезируется укороченная на С-конце форма данного белка размером от 94 кДа, не образуя АТІ. Несмотря на это, данная форма белка является мажорным иммуногеном при инфекции/иммунизации ВОВ человека и животных. До сих пор не изучено, как продукция данного неструктурного мажорного иммуногенного белка влияет на проявление свойств патогенности и иммуногенности ВОВ. Поэтому целью данной работы было получение ВОВ с направленно удаленным геном *ati* и изучение его свойств на модели мышей.

В качестве объекта исследования использовали ранее охарактеризованный клоновый вариант штамма LIVP ВОВ, из которого с помощью плазмиды интеграции/делеции $r\Delta ati$, несущей последовательности генома вируса, фланкирующие удаляемый регион, был получен штамм LIVP Δati .

На первом этапе было проведено сравнение патогенности штаммов LIVP и LIVP Δati ВОВ, которую оценивали на 3-недельных мышях линии BALB/c при заражении их исследуемыми вирусами в дозе 10^7 бляшкообразующих единиц (БОЕ) интраназальным способом, поскольку данный способ имитирует естественный путь заражения и обуславливает наибольшую чувствительность животных к данной инфекции. Было показано, что штамм LIVP индуцировал развитие клинически выраженной инфекции с гибелью 50 % животных, в то время как штамм LIVP Δati обуславливал проявление менее выраженных признаков заболевания и вызывал гибель только 20 % животных.

При изучении иммуногенности LIVP и LIVP Δati использовали мышей линии BALB/c возрастом 6–7 недель, которых внутрикожно инфицировали исследуемыми вирусами в дозе 10^5 БОЕ. Развитие ВОВ-специфичного клеточного иммунного ответа оценивали с помощью метода ELISpot по числу спленоцитов, продуцирующих γ -интерферон в ответ на стимуляцию смесью ВОВ-специфичных иммунодоминантных для мышей пептидов.

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00006-П.

Было обнаружено, что делеция гена *ati* у LIVP BOB не сказывается на динамике развития и уровне клеточного иммунного ответа мышей на вакцинацию.

Гуморальный иммунный ответ оценивали с помощью ИФА через изучение динамики синтеза IgM и IgG, специфичных к вирионным белкам BOB. По динамике и уровню продукции вирион специфичных IgM оба штамма BOB не различались. Но относительно синтеза BOB-специфичных IgG были выявлены различия между группами: по среднегеометрическим значениям обратных титров на 28, 42 и 56 день после инфекции (дпи) LIVPΔ*ati* заметно превосходил LIVP, при этом на 42 и 56 дпи — с высокой достоверностью. Одной из вероятных причин этого может быть тот факт, что отсутствие синтеза мажорного позднего неструктурного белка AT1 у LIVPΔ*ati* «не отвлекает» иммунную систему на синтез IgG к этому белку и обуславливает больший синтез антител, специфичных к вирионным белкам BOB.

Оценку протективного иммунитета, развившегося в ответ на вакцинацию мышей штаммами LIVP и LIVPΔ*ati* BOB, проводили, интраназально инфицируя животных на 60 дпи летальными дозами штамма GRI-90 BOK или штамма К-1 вируса экстремелии (ВЭ). При заражении BOK все животные, иммунизированные обоими вариантами BOB, выжили. При этом менее выраженные снижение массы тела и клинические проявления обнаружили у мышей, вакцинированных LIVPΔ*ati*, по сравнению с мышами, иммунизированными LIVP. При инфицировании мышей ВЭ различия между группами животных были более выраженными: в группе LIVP выжило 83 % животных, а в группе LIVPΔ*ati* — все животные.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что делеция участка генома LIVP BOB в районе гена *ati* привела к снижению патогенных свойств вируса LIVPΔ*ati* и увеличению продукции вирион-специфичных IgG в ответ на вакцинацию мышей данным мутантным вирусом, что обусловило, по сравнению с родительским LIVP, более высокий уровень защиты мышей от последующей летальной инфекции гетерологичными ортопоксвирусами. Поэтому штамм LIVPΔ*ati* может рассматриваться в качестве перспективного вектора для создания поливалентных рекомбинантных вакцин.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-269

РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН, МЕТОДОМ ИММУНОДИАГНОСТИКИ В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

RETROSPECTIVE DETECTION OF CASES OF MONKEYPOX VIRUS DISEASE BY IMMUNODIAGNOSIS IN THE REPUBLIC OF GUINEA

И. С. Шульгина, С. А. Пьянков, В. Ю. Тюрин, О. В. Пьянков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

I. S. Shulgina, S. A. Pyankov, V. Yu. Tyurtin, O. V. Pyankov

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ shulgina_is@vector.nsc.ru

Аннотация

В тезисах представлены результаты исследования, проведенного в Гвинейской Республике. В работе был использован уникальный для ВОО рекомбинантный белок MozAgMPXV. В образцах отобранной сыворотки крови были обнаружены специфические IgG к ВОО антитела. Сделаны выводы о возможном расширении работы и совершенствования средств диагностики на территории Западной Африки.

Abstract

The thesis present the results of a study conducted in the Republic of Guinea. The paper used a recombinant protein unique to the MPXV. Specific IgG to MPXV antibodies serum found in blood serum samples. Conclusions have been drawn about the possible expansion of work and improvement of diagnostic tools in West Africa.

С начала 2022 года случаи заболевания оспой обезьян отмечаются как в эндемичных, так и не эндемичных странах. В России тоже зафиксировано два случая. К июлю 2023 года по всему миру зарегистрировано 88 54 случаев, из которых 182 оказались летальными. В странах Западной Африки, которые являются эндемичными, данные показатели составляют 914 и 12 случаев соответственно. В связи с расширением сотрудничества Российской Федерации с дружественными странами наблюдается интенсивная трудовая миграция населения, которая может привести к повторам заболевания оспой обезьян на территории России.

В связи с этим, информация об эпидемиологической обстановке в странах с тесными экономическими связями становится актуальной и даёт возможность в случае необходимости осуществить защитные мероприятия против завоза особо опасного патогена первой группы — вируса оспы обезьян (ВОО) — на территорию Российской Федерации. Одной из таких стран является Гвинейская Республика.

На предыдущем этапе исследования методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли наличие антител к белкам ортопоксвирусов в крови жителей Гвинейской Республики. Было установлено, что население имеет низкий уровень иммунной прослойки. Только 7,1 % исследованных образцов содержали специфические IgG. Задачей текущего этапа исследования являлось выявление в ретроспективе случаев вызываемого ВОО заболевания по наличию специфических IgG к уникальным антигенам вириона в крови местного населения.

Материалы и методы

Выявление в исследуемых образцах сыворотки крови специфических IgG к ВОО проведено с использованием в качестве иммуносорбента планшета с иммобилизованным на поверхности лунок антигеном в виде рекомбинантного белка, состоящего из уникальных для ВОО аминокислотных последовательностей. Этот «мозаичный» белок, названный MozAgMPXV, был получен путем наработки его штаммом-продуцентом *E. coli* со встроенной с помощью плазмиды искусственно синтезированной последовательностью уникальных сайтов ДНК ВОО. Продуцент создан коллективом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и депонирован в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов организации. Работа выполнена в рамках государственного задания ГЗ-34/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (номер государственного учета НИР Рег. №121033100069-4).

Для подтверждения специфичности положительных результатов использовали зарегистрированное медицинское изделие «Вектор ИФА-Покс-IgG», предназначенное для выявления IgG к ортопоксвирусам в сыворотке и плазме крови человека. Подтверждение возможно благодаря высокой доле (более 90 %) гомологии антигенов

ВОО и вируса осповакцины (ВОВ), который в данном случае является основой иммуносорбента «Вектор ИФА-Покс-IgG».

Результаты

На текущем этапе исследования протестировано 500 образцов сыворотки крови местных доноров и пациентов медицинских учреждений Гвинейской Республики. Протокол исследования одобрен решением Этического комитета Гвинеи (№ 129/CNERS/16/).

Работа проводилась в три стадии:

1. Скрининг образцов методом ИФА на наличие специфических IgG к «мозаичному» белку состоящему из уникальных последовательностей аминокислот ВОО.
2. Скрининг выявленных на первой стадии работ как положительные образцов на наличие IgG к антигенам ортопоксвирусов с использованием тест-системы «Вектор ИФА-Покс-IgG».
3. Определение титров IgG к ВОО в положительных образцах со второй стадии в ИФА с использованием иммуносорбента с «мозаичным» белком.

В исследуемой выборке образцов сывороток крови доноров и пациентов были выявлены отдельные экземпляры, содержащие IgG к ВОО. Случаи их заболевания оспой обезьян медицинскими учреждениями не фиксировались. Данная ситуация объяснима отдаленностью мест проживания реконвалесцентов от медицинских учреждений. Отдаленность от диагностических учреждений не влияет на возможность контактов с нашими соотечественниками, работающими в Гвинее. Поэтому опасность передачи ВОО при перспективе наличия текущего заболевания от местных жителей сохраняется.

Выводы

В связи с существующей угрозой завоза случаев ВОО в Российскую Федерацию, необходимо расширение работы по скринингу местного населения на IgG к ВОО в целях уточнения доли реконвалесцентов. Она поможет определить степень угрозы по завозу ВОО в нашу страну. Рекомендуется обратить внимание на диагностику ВОО инструментальными методами у прибывающих из Западной Африки. Также остаются актуальны вопросы совершенствования средств диагностики ВОО.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-270

**GENOTYPING OF CANCER-ASSOCIATED KRAS MUTATION
BY DEOXYRIBOZYME BASED 4-ARMS DNA MACHINE**V.D. Ace¹, C. Patra¹, A.A. Eldeeb^{1,2}, D. M. Kolpashchikov³¹*SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*²*Almetyevsk State Oil Institute*³*University of Central Florida, USA*✉ veronikaacemail@gmail.com**Abstract**

Gene therapy is a promising approach in modern medicine, particularly in oncology but faces challenges in efficiency and selectivity leads to side-effects. To improve specificity, we aim to design a 4-arms DNA-machine capable of distinguishing between wild-type and mutated KRAS, a common oncogene. The DNA-machine is based on DNzyme technology, with a binary DNzyme detecting the mutation by cleaving a fluorescence reporter substrate (F-sub) when bound to the mutant KRAS mRNA. The machine's efficient melting temperature ensures specificity for the mutation. This DNA-machine will enable targeted gene therapy, selectively inducing cell death in the presence of the KRAS mutation, offering a potential advancement in cancer treatment.

Gene therapy, an emerging cancer treatment method, aims to address gene defects and modify cell properties by manipulating gene expression through knockdown in somatic cells. Despite its potential, gene therapy agents suffer from various side effects due to their low selectivity [1]. To minimize off-target effects, the goal is to activate these agents solely in the presence of specific oncomarkers. For instance, the KRAS proto-oncogene, when mutated, leads to improper translation and cancer development [2]. Therefore, this project aims to design and develop a 4-armed DNA machine capable of distinguishing between wild-type and mutated KRAS with only one DNA sequence mismatch.

To tackle this limitation, researchers have set their sights on developing a more targeted approach by activating gene therapy agents solely in the presence of specific oncomarkers. One such oncomarker of interest is the KRAS proto-oncogene, mutated form of which contributes to improper cell translation and the development of various cancers, including pancreatic, colorectal, and non-small cell lung cancer [2]. The project's goal is to design and construct a specialized 4-armed DNA machine that can accurately distinguish between the wild-type and mutated forms of the KRAS gene with just one DNA sequence mismatch.

KRAS plays a crucial role in transmitting instructions from outside the cell nucleus, regulating essential cellular processes such as growth, maturation, and programmed cell death through its encoded protein. However, mutations in KRAS can disrupt these processes, leading to uncontrolled cell growth and metastasis. The DNA machine being developed utilizes cutting-edge DNzyme technology, which relies on single-stranded DNA nucleotides exhibiting enzyme-like catalytic activity (Fig. 1).

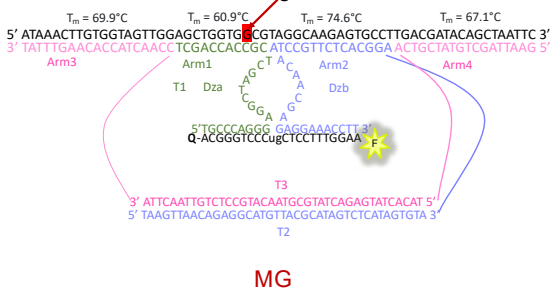
The engineered binary DNzyme machine includes two additional pairs of arms, with one set binding to the mRNA of the mutant KRAS analyte, and the other binding to a fluorescent substrate. When the machine detects the SNP mutation in KRAS, the catalytic core is activated, leading to the cleavage of the F-sub and the generation of detectable fluorescence, which can be accurately measured using a spectrophotometer. During the machine's design, its melting temperature was calculated to be 69.2 °C compared to the SNP target, ensuring efficiency and preventing unintended binding to other forms of KRAS with much lower melting temperatures.

The 4 arms DNA-machines were tested with synthetic SNP and wild type sequence of KRAS at a concentration of 10nM. It was incubated for 3 hours at 55 °C in a 200 mM Mg buffer. Also, machines without input were added as neg-

ative controls to show fluorescence background. We visualize results using a spectrophotometer, and found that matching DNA-machine and the sequence showed higher cleavage (Fig. 2).

4 arms DNA-machine for KRAS-G

Wild-type KRAS



MA

4 arms DNA-machine for KRAS-A

SNP KRAS

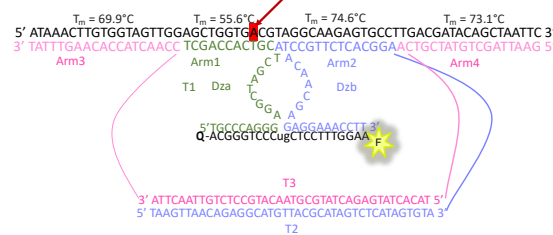


Fig. 1. The design of 4 arms DNA-machines targeting SNP and wild type KRAS

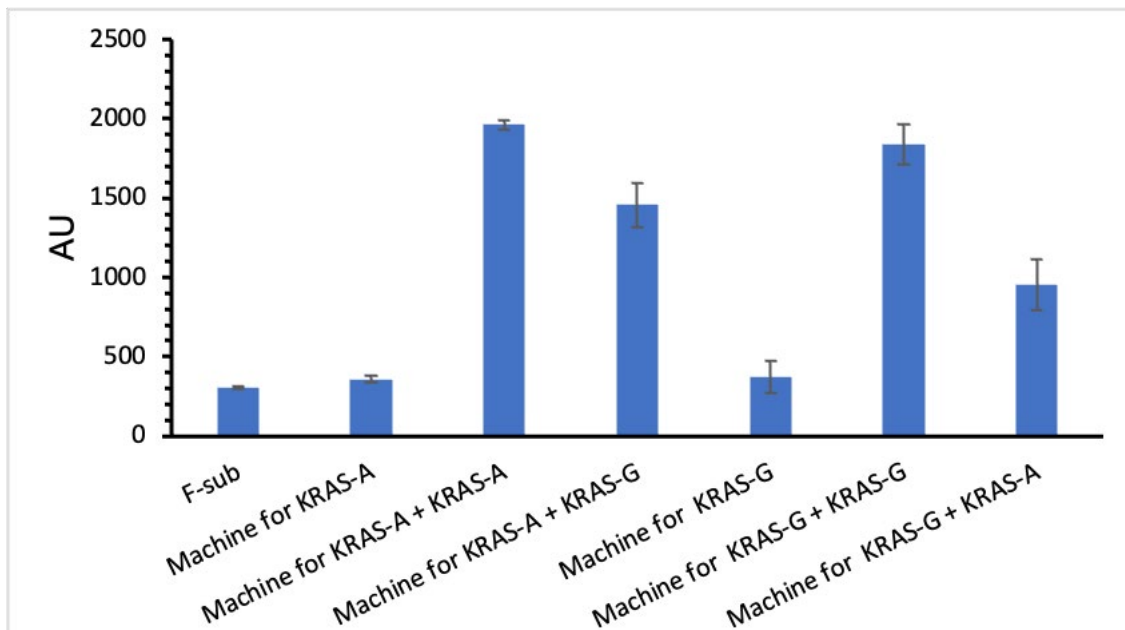


Fig. 2. Quantification of 3 independent cleavage experiments

In conclusion, this advanced DNA machine represents a significant breakthrough in cancer detection and treatment. By successfully identifying the presence of a SNP mutation in the KRAS gene, the machine can serve as an activator for gene therapy agents. These activated agents can then selectively target and cleave vital components, such as the housekeeping gene, leading to the targeted elimination of cancer cells only in the presence of the SNP in the 12 codon of KRAS analyte [3]. This advancement holds immense potential in revolutionizing the effectiveness and specificity of gene therapy in cancer treatment, offering hope to patients and researchers in the battle against cancer.

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. Birkeland E. et al. KRAS gene amplification and overexpression but not mutation associates with aggressive and metastatic endometrial cancer // Br. J. Cancer. 2012 Dec. 4. Vol. 107, № 12. P. 1997–2004. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23099803/>
3. Nedorezova D.D., Fakhardo A.F., Nemirich D.V. et al. Towards DNA Nanomachines for Cancer Treatment: Achieving Selective and Efficient Cleavage of Folded RNA // Angew. Chem. Int. Ed. 2019. Mar. 26. Vol. 58, № 14. P. 4654–4658. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30693619/>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-271

N-ALKYLSULFONYL MODIFICATIONS ARE PERSPECTIVE ANALOGOUS OF PHOSPHOROTHIOATES IN ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AND GUIDE RNAs

E. A. Akhmetova¹, O. V. Sergeeva^{2,3}, T. S. Zatsepin⁵¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow² Genterra JSC, Moscow³ Moscow State University, Chemistry Faculty

✉ Elizaveta.Akhmetova@skoltech.ru

Abstract

The main disadvantages of therapeutic oligonucleotides are the off-target activity and poor stability *in vivo*. Major solutions of such limitations are chemical modification and targeted drug delivery. In current research we investigated the influence of alkylsulfonyl modifications on the efficacy of antisense oligonucleotides and gRNAs for CRISPR/Cas system in combination with different approaches of the selectivity improvement.

Chemical modifications of the oligonucleotides can help to improve its stability from the degradation by endonucleases. Among widespread modifications are 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE, which significantly influence on the oligonucleotide stability. Together with enumerated 2'-OH modifications phosphorothioate modification plays crucial role in improving stability and efficacy additionally exemplifies standard modification of phosphate group in oligonucleotides with various functions. Recently N-(alkylsulfonyl) phosphoramidates were proposed as a potential, less toxic alternative to phosphorothioate modification [1]. The goal of our investigation is to analyze influence of alkylsulfonyl modifications (mesyl and busyl) on properties of different types of the therapeutic oligonucleotides like antisense oligonucleotides, activating RNase H, and guide RNAs for CRISPR/Cas9 genome editing system.

We synthesized and analyzed pool of gapmer antisense oligonucleotides contained mesyl and busyl groups both in the gap and wings and targeted long non-coding RNA (lncRNA) Malat1 — perspective target for the prostate cancer therapy [2]. All synthesized ASOs kept the activity of RNaseH in model experiments. We performed RT-qPCR for the evaluation of Malat1 level under the ASOs treatment and revealed preferable patterns of new modifications for the target depletion in 22Rv1 cancer cell line. Fully modified gapmers did not inhibit Malat1, what correlates with literature data, whereas partially modified ASOs showed up to 80% inhibition for the different ASO molecules. Several ASOs were conjugated with ligands to prostate-specific membrane antigen (PSMA), overexpressing in prostate cancer. It allowed selectively inhibit Malat1 in cancer cells with PSMA expression, comparing to the cells with PSMA depletion. Obtained results confirm the possibility of usage of mesyl and busyl modified antisense oligonucleotides and its application in therapeutic purposes via conjugation with specific cell ligands.

For the first time we introduced alkylsulfonyl modifications in the structure of guide RNA for CRISPR/Cas9 system. We added mesyl and busyl groups to published pattern [3] of fully chemically modified crRNAs with 2'-F, 2'-OMe, and phosphorothioate modifications and analyzed the influence of new modifications on the genome editing efficiency. We investigated modifications in crRNAs for two potentially therapeutical targets — hbb (hemoglobin subunit β) and pcsk9 (proprotein convertase). After the screening of singly modified crRNAs, we designed and synthesized multiply modified crRNAs with novel modifications in positions with best toleration. Heavy modification of guide RNA did not reduce the activity of Cas9. Comparative analysis of phosphorothioate and alkylsulfonyl modifications revealed slight increase in cleavage efficiency of mesyl modified RNAs as well as enhanced stability of oligonucleotides with novel groups. Combination of fully modified RNAs in complexes with high selective Cas9 variants did not affect the cleavage activity *in vitro*. Thus, such combination allows to cumulatively improve efficiency and selectivity of CRISPR/Cas9 system and expands its application in gene therapy.

To conclude, obtained results confirm that N-alkylsulfonyl modifications are perspective analogues for phosphorothioates and may be applicable in various types of therapeutic oligonucleotides.

References

1. Burakova E. A., Derzhalova A. S., Chelobanov P. B. et al. New oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups // Russian J. of Bioorganic Chemistry. 2019. Vol. 45. P. 662–668.
2. Ren S., Liu Y., Xu W. et al. Long noncoding RNA MALAT-1 is a new potential therapeutic target for castration resistant prostate cancer // The J. of Urology. 2013. Vol. 190. P. 2278–2287.
3. Mir A., Alterman J. F., Hassler M. R. et al. Heavily and fully modified RNAs guide efficient SpyCas9-mediated genome editing // Nature Communications. 2018. Vol. 9. P. 2641.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-272

**STUDY OF THE ROLE OF SMOKING-ASSOCIATED GENES
IN THE PATHOGENESIS OF LUNG CANCER***O. D. Biriukova¹, V. V. Kononchuk¹⁻³, O. R. Chesnokova⁴, V. V. Chuzhikov⁵, T. S. Kalinina¹¹*Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center
of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk*²*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk*³*Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk*⁴*Lyceum No. 12, Novosibirsk*⁵*Novosibirsk State Pedagogical University*

✉ o.biryukova@g.nsu.ru

Abstract

We aimed to identify genes associated with the pathogenesis of lung cancer (LC). Using TCGA data, we selected the *SLC35F5* and *NRP1* genes associated with smoking and survival rate in patients with LC. Their mRNA levels were further investigated in tumor samples. The expression of *SLC35F5* and *NRP1* was significantly reduced in the tumors of smokers and correlated with the size of the tumor and the presence of metastases, confirming the association with LC pathogenesis.

LC is one of the most common cancers. Most cases of LC are represented by adenocarcinoma (ADC) and squamous cell carcinoma (SqCC). The main risk factor for the development of LC is smoking. The highest correlation with the toxic effect of tobacco smoke was found for SqCC, while for ADC, this correlation was observed to a lesser extent [1, 2].

Tobacco smoke contains benzo[a]pyrene as its main component, which exerts both genotoxic (DNA damaging) and non-genotoxic effects (involving the binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and subsequent activation of the expression of its target genes). Many of AhR target genes play crucial roles in the process of carcinogenesis.

In this study, we aimed to identify genes involved in the pathogenesis of LC. Modern bioinformatics techniques have increased the ability to search *in silico* for potential molecular markers. To explore genetic alterations that occur during the development of cancer, we assessed the TCGA (The Cancer Genome Atlas) database [3, 4]. Considering the known increased AhR activation in active smokers [5, 6], we focused on genes whose expression in SqCC of the lung has a positive or negative correlation with AhR expression. From the TCGA data, we selected two genes, *SLC35F5* and *NRP1*, associated with survival in SqCC. *NRP1* is known to play a role in tumor angiogenesis, while *SLC35F5* belongs to the family membrane transport proteins.

To study the expression profile of *NRP1* and *SLC35F5* genes in LC and their association with clinicopathological characteristics of tumors, we collected a total of 86 pairs of tumor and normal lung tissue samples (32 for SqCC and 54 for ADC). All the patients included in the study had been diagnosed with LC and had not undergone neoadjuvant therapy. The samples were collected from the thoracic department of the Novosibirsk Regional Oncological Clinical Dispensary. We determined the expression levels of *NRP1* and *SLC35F5* in the obtained samples using real-time polymerase chain reaction (PCR).

Analysis of *NRP1* and *SLC35F5* expression revealed that their expression was decreased in both SqCC and ADC. Moreover, the strongest decrease in *NRP1* expression was observed in samples from smoking patients, while *SLC35F5* expression was decreased only in smoking patients. Using the TCGA resource, we found that expression of these genes is positively correlated with AhR expression. Thus, the observed significant decrease in *NRP1* and *SLC35F5* mRNA levels in tumors of smoking patients may be related to the AhR repressor (AhRR), whose expression is known to be elevated in tumors of smoking patients [7].

In SqCC, the gene expression was found to be associated with tumor size — mRNA levels of *NRP1* and *SLC35F5* were significantly lower in tumors larger than 5 cm. In non-smoking patients with ADC, a correlation was found between the expression of *SLC35F5* and the presence of lymph node metastases — the gene expression was higher in tumors of patients with metastases. Additionally, the expression levels of *NRP1* and *SLC35F5* were dependent on the age of the patients.

Thus, the genes selected by the proposed algorithm using TCGA during validation showed association with lung carcinogenesis. *NRP1* and *SLC35F5* expression was found to be associated with smoking status, tumor size and presence of metastases in patients with non-small cell lung cancer.

* This work was supported by the RFBR grant 22-15-00065.

References

1. Barbone F., Bovenzi M., Cavallieri F., Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men // *Chest*. 1997. Vol. 112. P. 1474–1479.
2. Yun Y.H., Lim M.K., Jung K.W. et al. Relative and absolute risks of cigarette smoking on major histologic types of lung cancer in Korean men // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005. Vol.14. P. 2125–2130.
3. Chandrashekar D.S. et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses // *Neoplasia*. 2017. Vol. 19. P. 649–658.
4. Chandrashekar D.S. et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform // *Neoplasia*. 2022. Vol. 25. P. 18–27.
5. Leclerc D. et al. Detrimental activation of AhR pathway in cancer: an overview of therapeutic strategies // *Current Opinion in Immunology*. 2021 Vol. 70. P. 15–26.
6. Christian W.J. et al. Spatiotemporal analysis of lung cancer histological types in Kentucky, 1995–2014 // *Cancer Control*. 2019. Vol. 26. P. 1.
7. Stueve T.R. et al. Epigenome-wide analysis of DNA methylation in lung tissue shows concordance with blood studies and identifies tobacco smoke-inducible enhancers // *Human molecular genetics*. 2017. Vol. 26, №. 15. P. 3014–3027.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-273

DEVELOPMENT OF FLUORESCENT HYBRIDIZATION PROBES FOR HIGHLY SELECTIVE DETECTION OF DOUBLE STRANDED DNA ANALYTES AT 37 °C

A. A. Bushaev¹, M. Ateiah¹, M. S. Rubel¹, D. M. Kolpashchikov^{2,3}¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg² Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA³ Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA

✉ bushaev@scamt-itmo.ru

Abstract

A DNA nanomachine is an association of a discrete number of DNA strands that undergoes structural rearrangements in response to the presence of a specific analyte [1]. DNA nanomachines have proven to be a sensitive and selective diagnostic method [2]. A disadvantage that hinders their practical use is that existing machines do not work under physiological conditions. The introduction of artificial locked nucleic acids (LNAs) into their structure can help increase the sensitivity of nanomachines at this temperature.

Our DNA nanomachine is equipped with the catalytic core of 10–23 deoxyribozyme which is split between Dza and Dzb (Fig. 1) and works as follows: the arms firstly unwind the double-stranded DNA, then the catalytic core of 10–23 deoxyribozyme forms and cleaves the fluorophore and quencher labeled substrate (F-sub) which means the detection of the fluorescent signal. A locked nucleic acid (LNA) is a modified RNA nucleotide in which the ribose moiety is modified with an extra bridge connecting the 2' oxygen and 4' carbon. LNA offers improved specificity and affinity in base-pairing as a monomer or a constituent of an oligonucleotide [3]. LNA nucleotides can be mixed with DNA or RNA residues in an oligonucleotide.

This study aims to develop a highly selective probe using deoxyribozymes and LNA modification for analysis of double stranded DNA and further development of this probe for using at room temperature. In this study, we developed a DNA nanomachine for the detection of Human papillomavirus infection (HPV infection) that is caused by a DNA virus from the *Papillomaviridae* family [4]. During development, several designs, differing in the number and position of the LNA modified nucleotides, were tested, but we had negative results with them. Developed DNA nanomachine is supposed to detect 120 base double-stranded DNA fragment of the virus. Universal probe F-sub was used in this study.

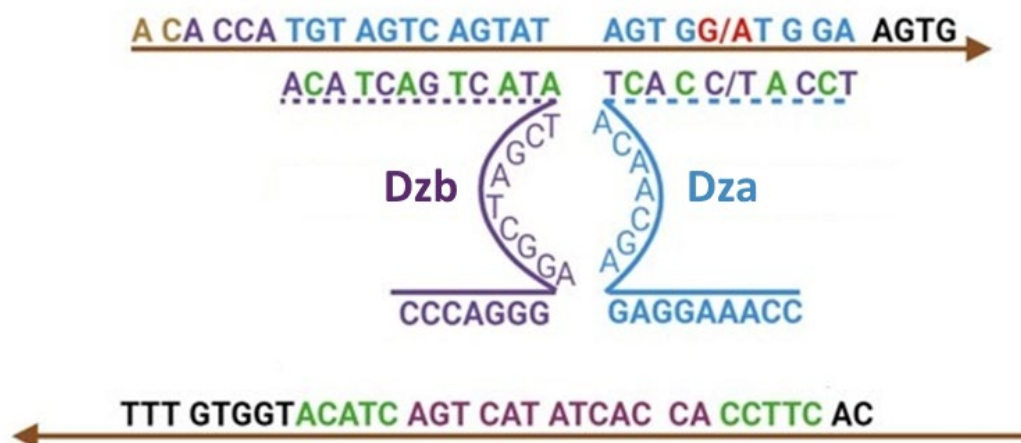


Fig. 1. The design of used DNA nanomachine. The machine consists of two arms. LNA modified nucleotides are marked with green letters

Target double-stranded sequence was successfully detected. We can say that the target sequence was detected, if the ratio of intensity of fluorescence of sample to intensity of fluorescence of background (F-sub + Machine) is more than 1.5 [5]. Also, we can see that the fluorescence signal of single nucleotide mismatching double-stranded DNAs (MM1 dsDNA and MM2 dsDNA) is higher than the background and has a ratio around 1.3. It means that detection of non-target

double-stranded DNA sequences is not completely excluded. Despite great sensitivity to target double-stranded DNA sequence and good selectivity to mismatching double-stranded DNA sequences, the design needs further improvement.

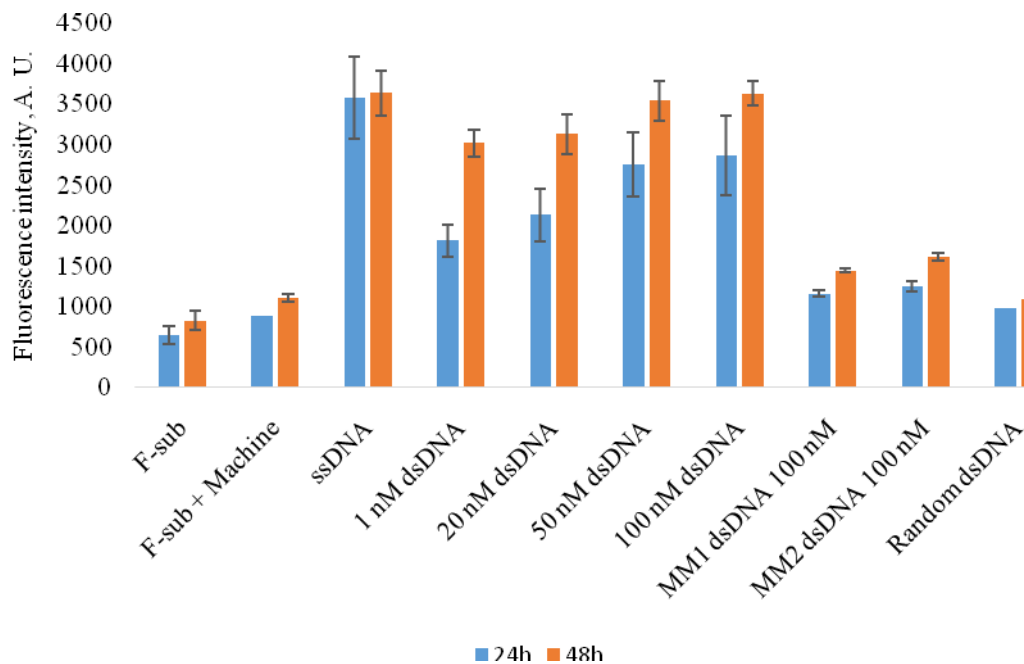


Fig. 2. Fluorescence intensities after 24h and 48 hours of incubation. Incubation was performed in a water bath at 37 °C: ssDNA — positive single strand of target DNA; dsDNA — double-stranded target DNA, MM1 and MM2 are two different single nucleotide mismatches. Average values of 3 independent measurements are presented with one standard deviation

References

1. Kolpashchikov D.M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // *Accounts of Chemical Research*. 2019. Vol. 52. P. 1949–1956.
2. Lyalina T.A., Goncharova E.A., Prokofeva N.Y. and others. A DNA minimachine for selective and sensitive detection of DNA // *Analyst*. 2019. Vol. 144. P. 416–420.
3. Veedu R., Wengel J. *Medicinal Chemistry of Nucleic Acids*. 2011. P. 335–337.
4. Milner D.A. *Diagnostic Pathology: Infectious Diseases* // Elsevier Health Sciences. 2015. P. 40.
5. MacDougall D., Crummett W.B. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry // *Analytical Chemistry*. 1980. Vol. 52. P. 2242–2249.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-274

MULTICORE DNA-MACHINE BASED ON BINARY DEOXYRIBOZYME FOR AMPLIFICATION-FREE DETECTION OF SARS-COV-2

L. A. Golovina¹, Z. Hussein¹, A. A. Eldeeb¹, A. B. Komissarov², D. M. Kolpashchikov³⁻⁵¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg²Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg³Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA⁴Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA⁵National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA

✉ golovina@scamt-itmo.ru

Abstract

In this research, we are developing and testing a new design of a DNA-machine that contains four deoxyribozymes, amplifying the signal from a fluorogenic substrate. We had an assumption that incorporating more active centers would decrease the limit of detection (LOD) and consequently enhance the test's sensitivity and reduces required test time.

Deoxyribozymes are synthetic single-stranded DNA molecules that hold great potential for use in diagnostic methods for various diseases, including coronavirus infection. Their high sensitivity, biocompatibility, stability, low synthesis cost, and ease of structure prediction explain their potential [1]. The binary deoxyribozyme consists of two main oligonucleotide sequences, each has a target-binding arm and substrate-binding arm. Together, they form a catalytic core that cleaves the reporter substrate, which is labeled with a fluorophore and quencher, upon binding of the deoxyribozyme to its target. After cleavage, the quencher can no longer absorb the fluorescence from the fluorophore, and the resulting fluorescence can be measured [2].

The aim of this research is to develop an alternative method for detecting the SARS-CoV-2 virus based on a DNA-machine consisting of binary deoxyribozyme, which does not require viral RNA amplification.

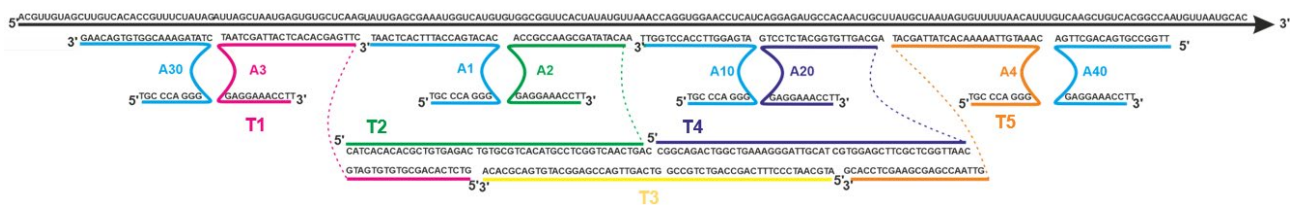


Fig. 1. The novel multicore DNA-machine

Our results demonstrate a significant improvement in the limit of detection (LOD) compared to a previously published DNA-machine. Specifically, the LOD for the synthetic analyte was 1 pM for the previous design [3], whereas our novel design with 4 catalytic cores achieved a LOD of 200 fM after 3 hours of incubation at 55 °C. Notably, our construct also showed effective results with viral RNA, achieving a LOD of 5 pM after 3 hours of incubation at 55 °C (Fig. 2, A), which is also lower than what the previous design has showed after 3 hours — 26 pM [3]. Furthermore, we observed that our novel construct was able to detect the viral RNA after only 1 hour of incubation with a LOD of 28 pM (Fig. 2, B).

The DNA-machine that we propose has been demonstrated to be highly effective in detecting nucleotide sequences in a shorter incubation time. In fact, our experiments show that detection can be achieved in just 1 hour, and even in 30 minutes of incubation. Additionally, we calculated the LOD for each catalytic core separately in the multicore construction. Interestingly, our results reveal that the catalytic activity of the deoxyribozyme is dependent on the targeted nucleotide sequence. These findings have important implications for the development of future nucleotide detection technologies.

In conclusion, the research has shown that the DNA-machine design under consideration is effective, and its ability to deliver results in a shorter time frame offers exciting possibilities for patient usage in home settings.

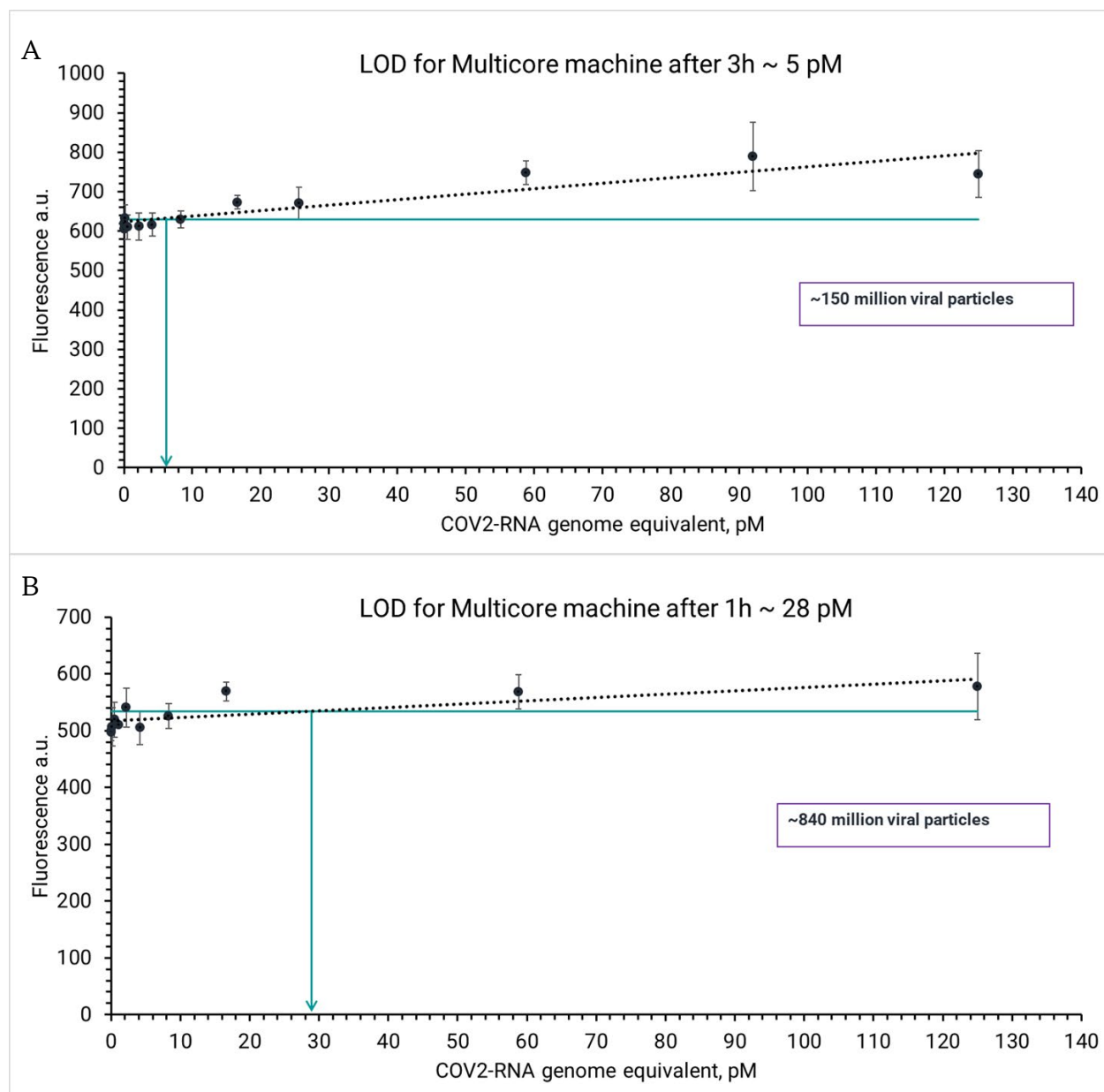


Fig. 2. A — LOD for multicore DNA-machine after 3h of incubation with viral RNA; B — LOD for multicore DNA-machine after 1h of incubation with viral RNA. Threshold line for the determination of LOD is set at 640 a.u. and 533 a.u. respectively, which correspond to three standard deviations of the background above the background average. The error bars are one standard deviation of the average

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. Gerasimova Y. V., Kolpashchikov D. M., Angew. Folding of 16S rRNA in a signal-producing structure for the detection of bacteria // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2013. Vol. 52. P. 10586–10588
3. El-Deeb A. A., Zablotskaya S. S., Rubel M. S. et al. Toward a home test for COVID-19 diagnosis: DNA machine for amplification-free SARS-CoV-2 detection in clinical samples // ChemMedChem. — 2022. — Vol. 17, № 20. — P. 3599–3605.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-275

ADVANCING DNA AUTOMATION: MIRNAS-REGULATED “NOT-GATE” LOGIC ELEMENTS BASED ON DEOXYRIBOZYME DNA MACHINES*

Z. Hussein^{1,2}, V. V. Smirnov¹, A. A. Eldeeb^{1,2}, D. M. Kolpashchikov³⁻⁵¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg²Almetyevsk State Oil Institute³Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA⁴Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA⁵National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA

✉ zain@scamt-itmo.com

Abstract

In this study, we developed binary deoxyribozyme-based DNA machines that function as “NOT-GATE” logic elements. Our DNA machines successfully implemented the «NOT» logic functionality using an allosteric mechanism with a catalytic core sequence, serving as the functional area, and a hairpin structure.

Logic gates are commonly defined as systems that recognize and process input signals based on established rules, resulting in output signals representing 1 or 0. The significant advantage of employing DNA machines as logic gates lies in the predictable behavior of these constructs, enabled by the principle of base pairs complementarity. As a result, the utilization of DNA machines as logic gates represents a crucial step towards the development of a DNA molecular computer, capable of analyzing inputs of nucleic acid strands [1].

Deoxyribozymes are specific short DNA molecules which offer several advantages, such as high chemical stability, low synthetic cost, and easy predictability and modification of their structure. In particular, binary deoxyribozymes offer high specificity for analyte sequence recognition. They consist of two subunits Dz_a and Dz_b which combine and form a catalytic core in the presence of the complementary target sequence and can perform RNA substrate cleavage reaction. These features make deoxyribozymes a powerful tool for various applications in biological research [2].

In this research, binary deoxyribozyme-based DNA machines were developed to behave as «NOT-GATE» logic elements. The binary deoxyribozyme’s two subunits were designed to attach to a common DNA scaffold via Watson-Crick base pairing to form DNA machines with increased performance. We took advantage of riboswitch’s natural property to create the «NOT» logic, which modifies the output based on the presence of an inhibitory input. Dz_a was designed with a hairpin, which provides an allosteric mechanism. The hairpin is intended to hybridize with miRNA hsa-let-7d-3p given as an inhibitory input since it is downregulated in breast cancer cells [3]. Due to nucleic acids’ capability to make stable bonds even when the bases are not completely complementary, the allosteric, switch-based hairpin can bind both the particular miRNA and to itself.

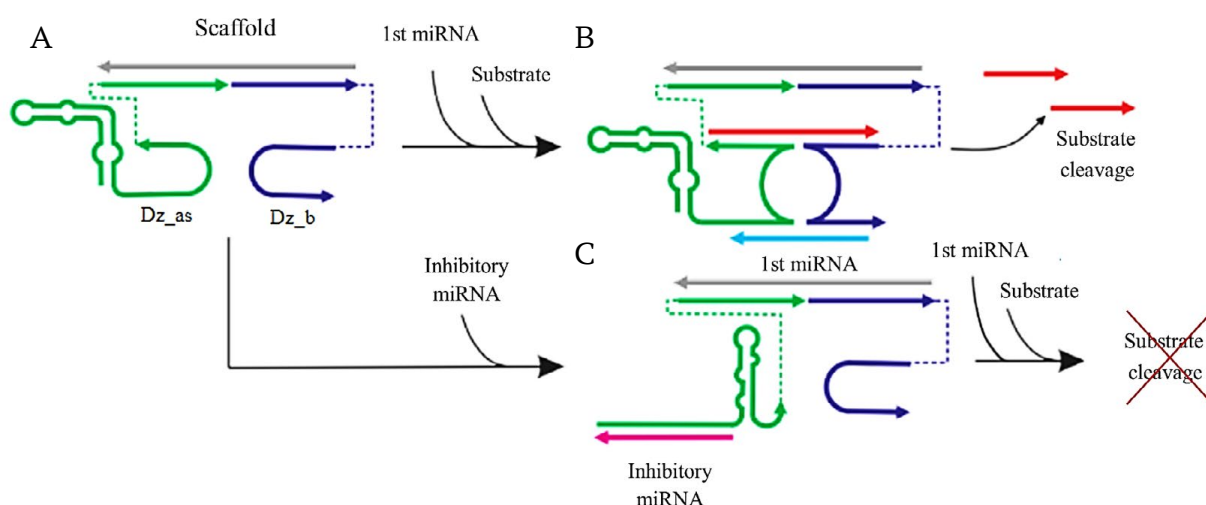


Fig. 1. Demonstration of 2iINHIBIT gate’s logic behavior

*The research was supported by the Priority 2030 Federal Academic Leadership Program.
© Z. Hussein, V. V. Smirnov, A. A. Eldeeb, D. M. Kolpashchikov, 2023

Using the «NOT» logic, the 2-input inhibit (2iINHIBIT) and the 3-input inhibit (3iINHIBIT) gates were created. Dz strands were designed to function as miRNA-dependent switches. Different conformations of these strands are more stable than others. In 2iINHIBIT gate, the initial conformation with an exposed catalytic core sequence predominates (Fig. 1, A). The catalytic core is formed in the presence of the first miRNA, which is a marker that can be overexpressed in cancer cells. Consequently, a fluorophore and quencher-labeled substrate is cleaved and fluorescence is generated (Fig. 1, B). Conversely, the structure shifts when the inhibitory input is present, favoring the second conformation, which results in the blockage of the substrate-binding area and inhibition of the catalytic activity (Fig. 1, C).

The 3iINHIBIT gate was designed to work only in the presence of two cancer markers and will be inhibited in the presence of one inhibitory marker (Fig. 2, A). For the designing of 3iINHIBIT gate, the Dza strand from the 2iINHIBIT gate and the Dzb strand from a developed 3-input AND (3iAND) gate — which requires three inputs to produce a positive output — were combined. The 3iINHIBIT gate demonstrated the correct predicted output (Fig. 2, B).

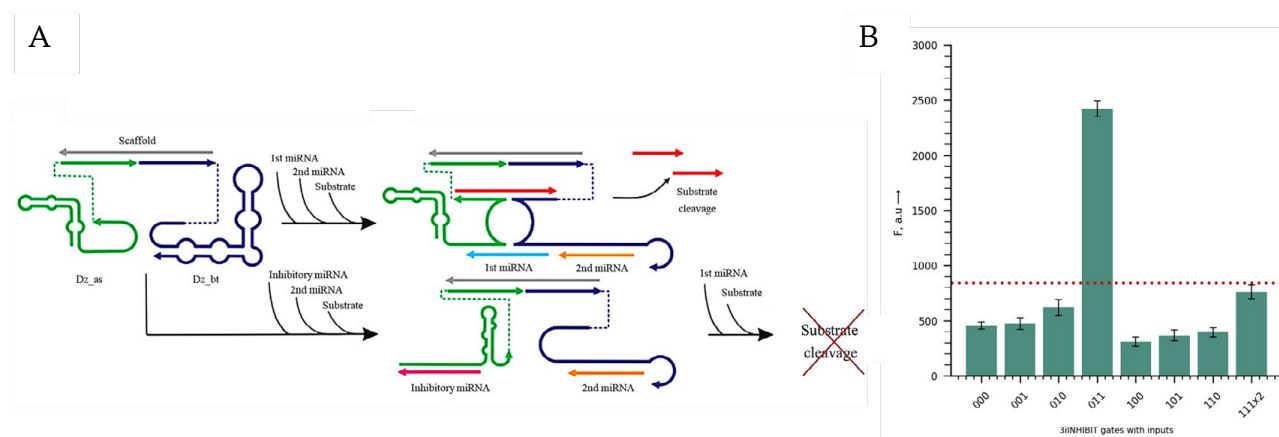


Fig. 2. A — Demonstration of 3iINHIBIT gate's logic behavior. B — Fluorescence signal generated by 3iINHIBIT gate under different conditions (xyz): x — inhibitory miRNA; y — first miRNA; z — second miRNA; 0 — absence; 1 — presence

DNA machines based on deoxyribozymes offer a promising approach for constructing logic gates that can be applied in various biological applications. In particular, these systems have potential in therapy, as they can be employed for the selective cleavage of mRNA in tumor cells in the presence and absence of specific markers. These findings highlight the broad potential of DNA machines for advancing molecular computing and biological research.

References

1. Macdonald J., Stefanovic D., Stojanovic M. N. DNA computers for work and play // *Sci Am.* 2008. Vol. 299, № 5. P. 84–91.
2. Kolpashchikov D. M. A Binary Deoxyribozyme for Nucleic Acid Analysis // *ChemBiochem.* 2007. Vol. 8, № 17. P. 2039–2042.
3. Yang Z. et al. dbDEMC 2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № D1. P. D812–D818.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-276

CANCER CELL DEATH INDUCED BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES *

E. V. Misnik¹, A. A. Eldeeb^{1,2}, D. M. Kolpashchikov³⁻⁵¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg²Almetyevsk State Oil Institute³Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA⁴Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA⁵National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA

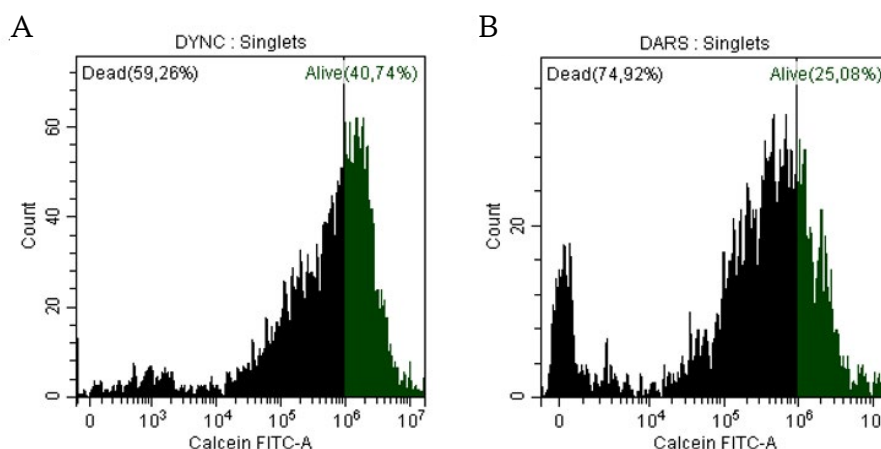
✉ misnik@scamt-itmo.ru

Abstract

In the present study, we examined a library of antisense oligonucleotides as potential cancer treatment agents. Identification of therapeutic candidates was performed with two rounds of selection for the human ovarian adenocarcinoma cell line SKOV-3. We have identified two promising targets whose manipulation exerts a significant impact on inducing cellular stress and subsequently reduces cell viability.

Nucleic acid-based technologies are known as a broad field in the treatment of diseases. Among them, Antisense oligonucleotides (ASO) can be especially highlighted, which are short sequences capable of specifically attaching to the target RNA via Watson-Crick base pairing, provoking intracellular ribonuclease H for subsequent degradation of the DNA-RNA duplex [1]. Based on this approach, we observe many examples that have proven their effectiveness, since ASO-based drugs have been recognized by the FDA and the EMA [2, 3]. However, it is worth noting that none of the therapeutic agents in this category has ever been approved as antitumor therapy. One of the critical factors is the search for appropriate targets. In light of this, we propose a compelling solution to this challenge: the identification of a vulnerable target gene capable of triggering the apoptosis pathway upon suppression. This approach holds the potential to unlock the development of a highly efficient cytotoxic agent.

A systematic search was carried out for target genes from various literature sources and databases (DepMap and OGEE) which provide information on the accessibility and expression of the gene in various cell lines. As a result, 13 genes were selected: DHX8, DHX9, CSE1L, DARS1, DHPS, COPB1, AP2M1, DYNC112, EEF1A1, EEF2, EIF2S1, EIF2S3, PSMB2. To increase the chance of ASO's attachment to the targeted mRNA, several designs were created for different regions of the gene to overcome the decrease in affinity as a consequence of the extensive secondary structure. Primary screening was carried out via MTT cytotoxicity test after 24–48 h of transfection of oligonucleotides using liposomal delivery (Molecta, Russia). The agents that showed the greatest cytotoxicity were selected for secondary screening. Cell viability was assessed by measuring the activity of intracellular esterases using the fluorescent dye Calcein AM (Invitrogen, USA). As a result, two of the most toxic ASO were identified for the DARS1 and DYNC112 genes (see Figure), the stress level of cells reaches 43 % at the concentration of 100 nM and 65% at 250 nM after 24 h.



Results of transfection of the best oligonucleotides at the concentration of 250 nM after 24 h in SKOV-3 for A — DYNC112 and B — DARS1

*The research was supported by the Priority 2030 Federal Academic Leadership Program.
© E. V. Misnik, A. A. Eldeeb, D. M. Kolpashchikov, 2023

Thus, in this study, potential therapeutic agents were obtained. We plan to expand the number of cell lines studied and continue the detailed investigation of the mechanisms of cell death.

References

1. Bajan, S.; Hutvagner, G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells* 2020, 9, 137.
2. Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther.* 2017 May 3;25(5):1069-1075.
3. Kim YJ, Sivetz N, Layne J, Voss DM, Yang L, Zhang Q, Krainer AR. Exon-skipping antisense oligonucleotides for cystic fibrosis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Jan 18.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-277

NEW MARKER GENES OF TUMOR CELL RESISTANCE TO DOXORUBICIN AND THE DEVELOPMENT OF DRUG CANDIDATES FOR ITS THERAPY*

A. D. Moralev^{1,2}, O. V. Salomatina^{1,3}, M. A. Zenkova¹, A. V. Markov¹¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*³*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉arseniimoralev@gmail.com

Abstract

Key genes associated with tumor cell resistance to doxorubicin (Dox) were identified. The screening of P-glycoprotein (P-gp) inhibiting activity of 8 amides of soloxolone was carried out. Through molecular docking, we demonstrated the ability of compounds to bind the transmembrane domain of P-gp. Hit compound **sg-650** enhanced the intracellular accumulation of Rhodamine 123 and Dox, synergistically increased cytotoxic effects of Dox *in vitro*.

Multidrug resistance (MDR) poses a significant challenge in cancer chemotherapy. While extensive research has focused on understanding the mechanisms underlying MDR development, such as the overexpression of efflux transporters like P-gp, there are currently several issues in MDR therapy: a lack of comprehensive knowledge about regulome governing this pathological process in tumor cells, and an absence of selective inhibitors targeting P-gp available in the pharmaceutical market. Previously, our group synthesized and studied soloxolone amides, which have a pronounced anti-tumor potential and can pass through the blood-brain barrier. This study aimed to address these challenges by (1) identifying new marker genes associated with the resistance of tumor cells to Dox and (2) evaluation of the ability of 8 soloxolone amides (Fig. 1) mentioned above to inhibit P-gp mediated efflux in tumor cells with MDR.

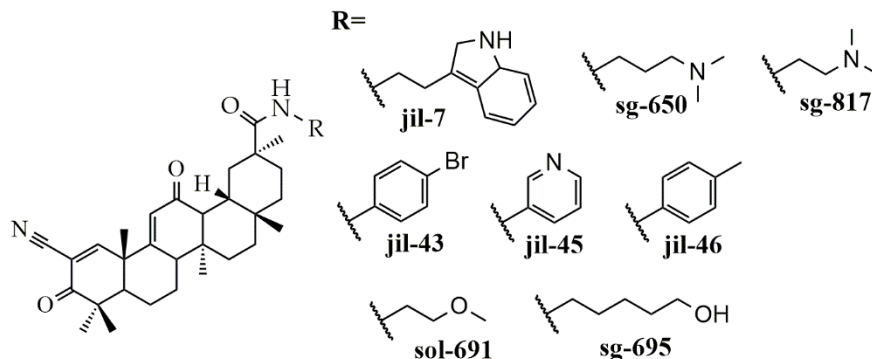


Fig. 1. Structure of investigated soloxolone amides

In order to identify marker genes associated with MDR, a comprehensive bioinformatics analysis was conducted. This analysis included the re-analysis of cDNA microarray datasets (GSE57470, GSE47670, GSE24460) comprising tumor cells from diverse origins exhibiting resistance to Dox. Differentially expressed genes (DEGs) associated with MDR were determined. Functional annotation of the DEGs was carried out to gain insights into their biological functions. Furthermore, gene network reconstruction and analysis were conducted to elucidate the interplay and regulatory relationships among the identified DEGs. Additionally, the association of the identified DEGs with the survival of cancer patients was investigated to assess their potential clinical relevance. This complex bioinformatics approach allowed for the identification and characterization of MDR-associated marker genes, providing valuable insights into the underlying mechanisms of multidrug resistance in cancer cells. As a result, known: *ABCB1* (encodes P-gp) and new: *CCND1*, *SEH1L*, *GJA1*, *TUBA4A*, *PLCB1*, *TCF3*, *ZYX*, *ABAT*, *EIF5*, *PGK1* MDR-associated marker genes were determined.

The next part of the research included molecular docking of 8 soloxolone amides to the transmembrane domain of P-gp, key efflux transporter of ABC-family. It was shown that all compounds are able to interact directly with P-gp

*This work was supported by the Russian Science Foundation No. 23-14-00374.

active site with low binding energies (< -9) kkal/mol) as depicted at Fig. 2, A. Further validation of P-gp inhibiting activity of investigated triterpenoids was carried out on KB-8-5 human cervical cancer cells and RLS40 murine lymphosarcoma cells with the P-gp-mediated MDR phenotype. It was shown that lead compound **sg-650** in non-toxic concentration ($40 \mu\text{M}$) enhanced intracellular accumulation of Rhodamine 123 and Dox (P-gp substrates) in KB-8-5 cells by 10.4 and 1.5 folds, respectively (Fig. 2, B–C). Also, sg-650 synergistically increased cytotoxicity of Dox in dose-dependent manner showing MDR-reversal effect. Similar effects were observed in the independent experiments with **sg-650**-treated RLS40 cells.

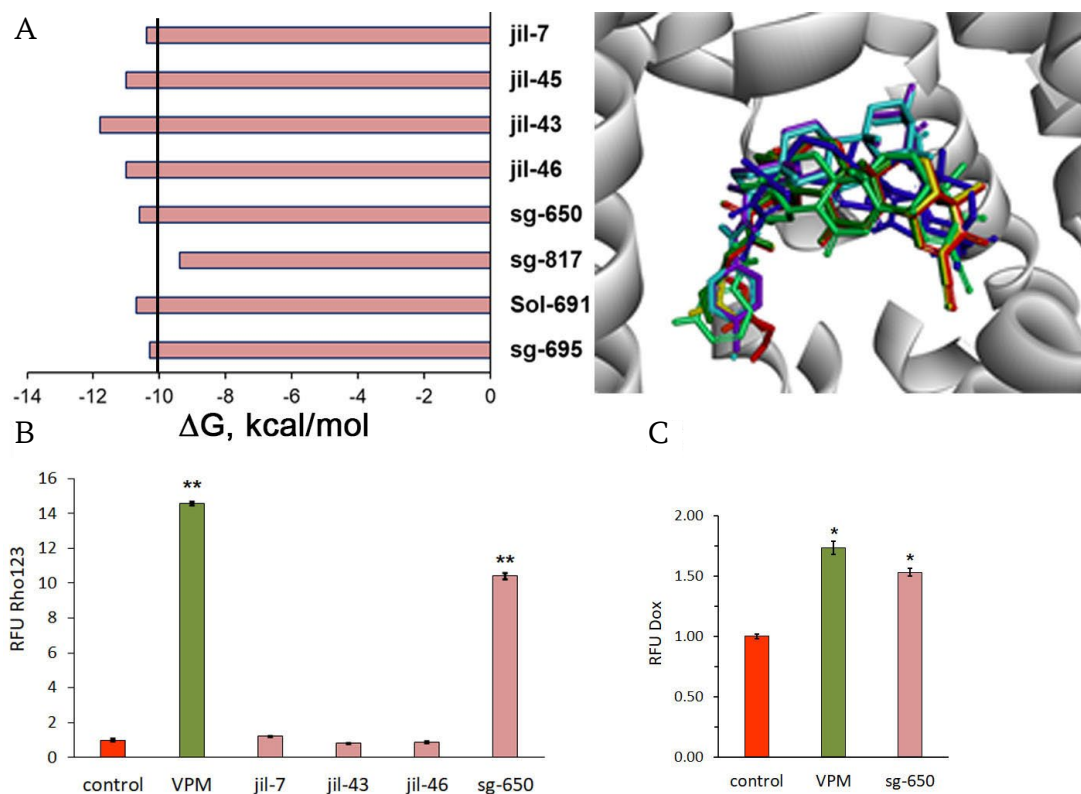


Fig. 2. A — The ability of semisynthetic triterpenoids to bind active site of P-gp via molecular docking. Free binding energies (left) and configurations in P-gp transmembrane domain (right); B — Rhodamine 123 accumulation assay in KB-8-5 cells; C — Doxorubicin accumulation assay in KB-8-5 cells

Taken together, the data obtained expand our understanding of the mechanisms of MDR development in tumor cells and indicate the possibility of using triterpenoids as a promising platform for the development of novel selective P-gp inhibitors.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-278

DEPENDENCE OF THE AFFINITY OF OLIGONUCLEOTIDES ON CHEMICAL MODIFICATIONS AND THE LENGTH OF NUCLEOTIDE SEQUENCESK. I. Mosentsova¹, A. V. Toropova¹, M. Nour¹, A. Eldeeb^{1,2}, D. M. Kolpashchikov³⁻⁵¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg²Almetyevsk State Oil Institute³Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA⁴Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA⁵National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA

✉ ksemoss@gmail.com

Abstract

In the work, such methods of changing the affinity of DNKzymes as chemical modifications and changes in the length of the nucleotide sequences of the arms were considered. This makes it possible to prioritize the activation of two types of DNKzymes gates to determine the concentration of an oncomarker in solution.

Now, the use of oligonucleotides is a promising tool for the diagnosis and therapy of diseases associated with disorders in the body's own nucleic sequences. Binary DNKzymes are molecules consisting of two chains, each of these chains has substrate- and analyte-binding arms. This design has a catalytic activity, which is carried out by a catalytic core divided into two parts. Binary DNKzymes can be used as a biosensor for detecting different concentrations of small molecules [1]. We propose to use different designs of molecular gates for cancer diagnosis. miRNA-92a is used as a marker, this cancer marker is overexpressed in cancer cells, but in healthy cells it is also present in lower concentrations [2]. For each of these concentrations, a different design of DNKzymes has been developed, we use YES and the 5th gate.

However, during the development of the concept, we encountered the problem of the sequence of gate activation in one reaction mixture: the reference 5th gate is activated before the YES gate. This prevents the biosensor from working, since there is a shift in the activation peak, and it becomes difficult to determine the concentration of the marker in the presence of YES and 5 gates in the solution. To avoid this problem, it is necessary to increase the affinity of the YES gate and reduce it in 5.

There are two main tools for influencing affinity: these are chemical modifications of nucleotides and changes in the length of the sequence. We have considered the thiophosphate modification for the fifth gate and the 2-O-methyl modification for the YES gate.

As a result, we solved the problem of priority activation of YES gates, but there is no inhibition of gate activity in high concentrations of the marker, this may be due to too high affinity for the marker. This problem may prevent the recognition threshold for the biosensor from being set, and a possible solution may be to change the design or response parameters.

To solve this problem, it is proposed to change the length of the nucleotide sequence of the arms of DNKzymes, thereby affecting their Gibbs energy (ΔG). The lower the value of ΔG , the higher the stability of the system and, accordingly, the higher the affinity of the sequences [5].

Thus, the prioritization of YES gates was successfully achieved (Fig. 1, 2), and the property of inhibition of DNKzym at high concentrations of the marker was not lost. The data obtained confirm the successful establishment

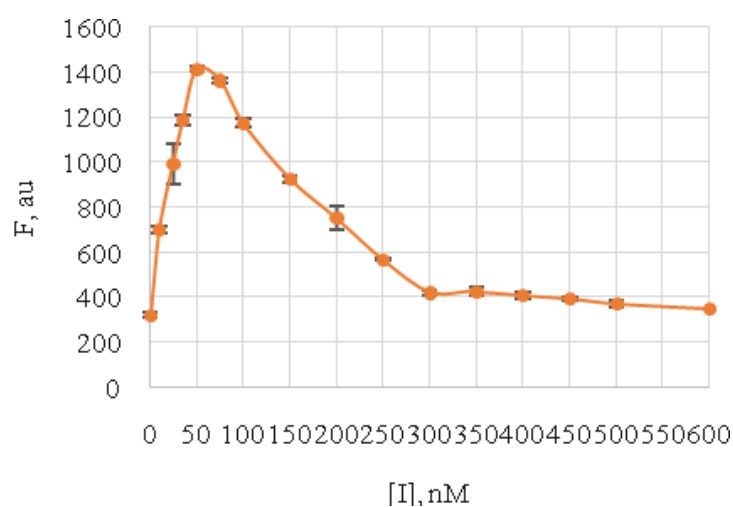


Fig. 1. Graph of changes in the fluorescent activity of unmodified YES gates in the presence of unmodified 5th gates with different arm lengths depending on the concentration of microRNAs in the reaction solution, incubation period — 1 hour

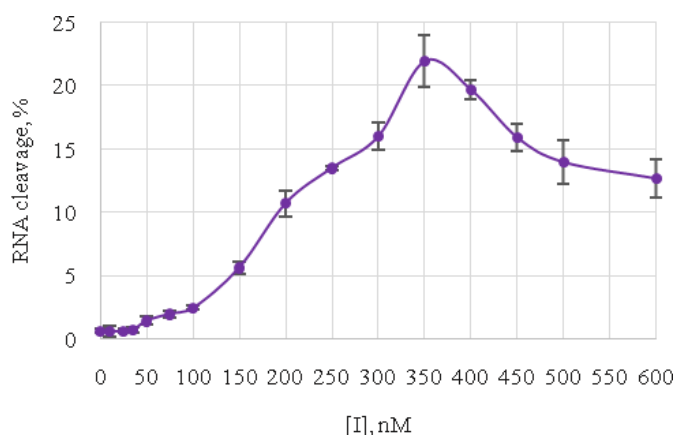


Fig. 2. Graph of changes in the enzymatic activity of the 5th gate without modification with different arm length in the presence of the YES gate without modification depending on the concentration of microRNA in the reaction solution, incubation period — 24 hours

of a clear hierarchy of gate activation, as well as the preservation of the activation peak with subsequent inhibition of gate operation at higher concentrations of the marker.

References

1. Kolpashchikov D.M. A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis // *ChemBioChem*. 2007. T. 8. № 17. C. 2039–2042.
2. Zhang C. et al. Cancer diagnosis with DNA molecular computation // *Nature nanotechnology*. 2020. T. 15. № 8. C. 709–715.
3. Tulpan D., Andronescu M., Leger S. Free energy estimation of short DNA duplex hybridizations // *BMC bioinformatics*. 2010. T. 11. № 1. C. 1–22.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-279

SEARCH FOR REGULATORY GENES AND SMALL-MOLECULAR INHIBITORS OF THE HIGHLY AGGRESSIVE PHENOTYPE OF GLIOBLASTOMA*K. V. Odarenko¹, O. V. Salomatina^{1,2}, N. F. Salakhutdinov², M. A. Zenkova¹, A. V. Markov¹¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉ k.odarenko@yandex.ru

Abstract

Four sets of RNA-sequencing data were re-analyzed, and *INHBA* and *VEGFC* were found to be novel regulators of the highly aggressive mesenchymal phenotype of glioblastoma; their expression was validated *in vitro*. In the library of amide derivatives of soloxolone, the compound Jil-46 was identified, which blocked glial-mesenchymal transition (GMT), inhibited stemness, and induced apoptosis in U87 glioblastoma cells.

Glioblastoma is the most common and aggressive brain tumor with a median survival of 15 month. Mechanisms for high aggressiveness of glioblastoma are currently under active investigation. Genome-wide studies have revealed four molecular subtypes of glioblastoma, namely neural, proneural, classical, and mesenchymal. It has been shown that radiation and chemotherapy induce the transition of proneural glioblastoma to mesenchymal phenotype, which is accompanied by an increase of invasiveness, stemness, and drug resistance [1]. Considering the inhibition of glial-mesenchymal transition (GMT) as a prospective strategy for glioblastoma therapy, we set ourselves the following tasks: (1) to find new targets for gene therapy within GMT regulome, and (2) to analyze the library of amide derivatives of soloxolone for the search of potential GMT inhibitors.

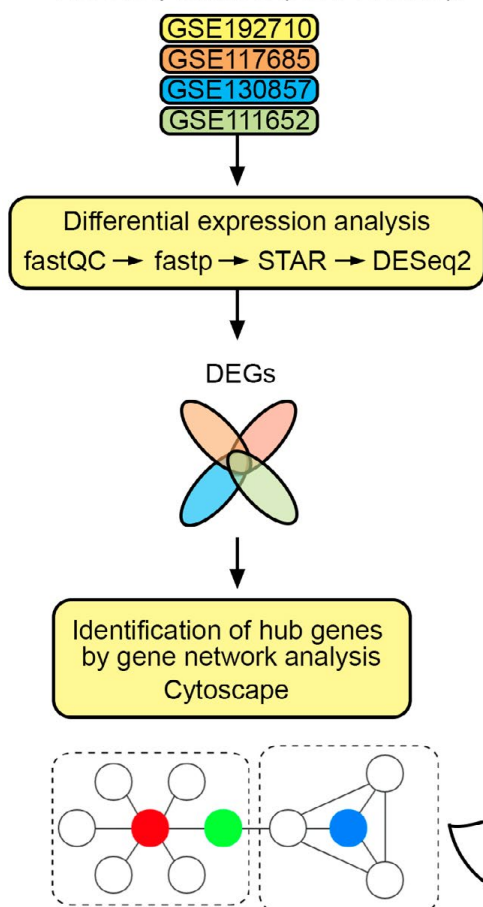
First, we reanalyzed four RNA-seq datasets (see Figure, A). For each dataset, we compared transcriptomes of proneural and mesenchymal glioblastoma cells: 62 upregulated and 71 downregulated differentially expressed genes (DEGs) were shared by at least three datasets. Functional annotation showed the enrichment of DEGs with gene ontology terms related to the regulation of glial cell proliferation, focal adhesion, nitric oxide metabolism and p38MAPK signaling. Next, DEGs were used to construct a gene network in Cytoscape using the GeneMANIA database. Three topological analysis methods, namely “Degree”, “Betweenness”, and “MCC”, revealed 10 hub genes overexpressed in GMT: *VEGFC*, *INHBA*, *KDR*, *EPHA2*, *NRG1*, *MAP3K5*, *PLCL1*, *NPY1R*, *HSP90AA1* and *WDR76*. Additionally, *VEGFC* and *INHBA* correlate with mesenchymal phenotype and worse patient survival in the TCGA GBM cohort. *In silico* reconstruction of the relationship between *VEGFC/INHBA* and glioblastoma regulatory network further verified their regulative function, since both of them had links to genes associated with migration and GMT signaling pathways. *In vitro* evaluation showed that induction of GMT in U87 by transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) increased *VEGFC* and *INHBA* levels by 2.8 and 1.5 times, respectively (see Figure, B).

Previously, our research team developed the derivatives of soloxolone methyl with amide moieties introduced at the C-30 atom, which could cross the blood-brain barrier and reduce the growth of glioblastoma in mice [2]. Here, we screened the library of soloxolone amides and found the hit compound Jil-46, which inhibited morphological changes, adhesion loss, and migration in TGF- β 1-stimulated U87 cells. Analysis of molecular markers further confirmed GMT inhibition: Jil-46 downregulated the mesenchymal markers N-cadherin, fibronectin, Slug and β -catenin and upregulated the proneural marker OLIG2. Since GMT is involved in the maintenance of cancer stem cells (CSCs), we examined the effect of Jil-46 on the stemness of U87 cells in 3D culture. It was shown that Jil-46 reduced the growth of primary and secondary spheroids and caused a 2-fold decrease in CSC population. Besides, Jil-46 induced apoptosis in U87 cells and showed a synergistic effect on tumor cell viability when used with temazolomide.

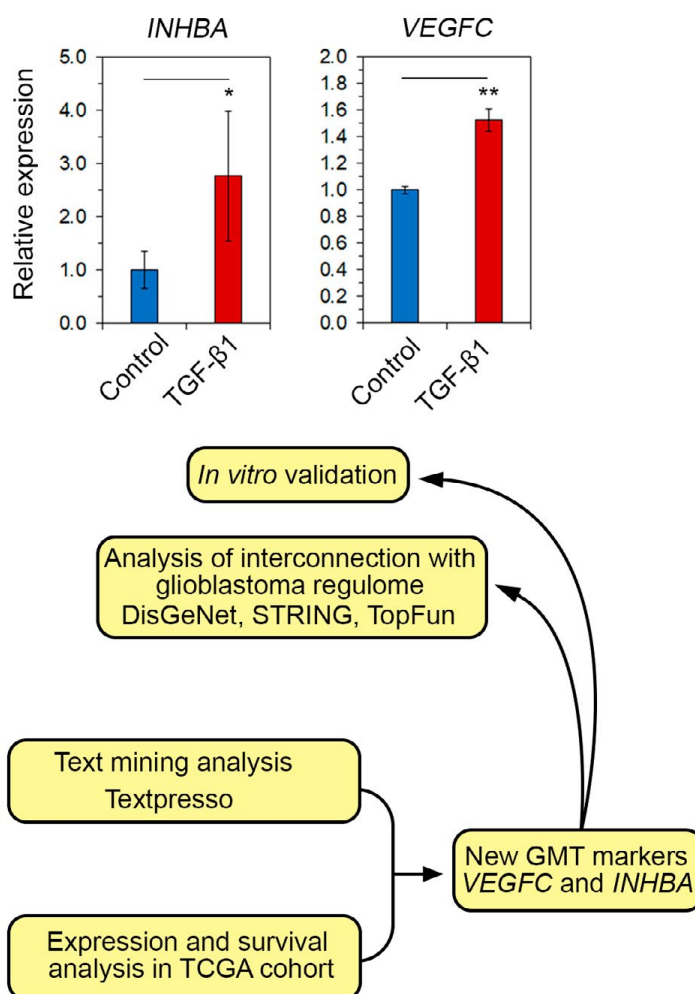
Taken together, our results demonstrate two promising targets for glioblastoma gene therapy, *INHBA* and *VEGFC*, which play an important role in the regulation of GMT. In addition, we identified the GMT-inhibitory activity of Jil-46, which could potentially be used as an adjuvant therapy for glioblastoma to reduce the invasiveness and stemness of tumor cells.

* This research was funded by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-14-00374).

A RNA-seq datasets (NEU vs MES):



B



A — The pipeline for bioinformatics analysis; B — The expression of *INHBA* and *VEGFC* assessed in TGF- β 1-stimulated U87 cells with RT-qPCR

References

1. Fedele M. et al. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol. 20, № 11. P. 2746.
2. Markov A. V et al. Novel Soloxolone Amides as Potent Anti-Glioblastoma Candidates: Design, Synthesis, In Silico Analysis and Biological Activities In Vitro and In Vivo // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15, № 5. P. 605.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-280

INTESTINAL MICROBIOME AS A FACTOR IN ACTIVATING THE INFLAMMATORY PROCESS IN THE COLON IN AN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE EXPERIMENTAL MODEL*

A. Saeidi

*Novosibirsk State University
Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk*

✉ saeidi.arsalan1377@gmail.com

Abstract

The gut microbiota is a diverse collection of microorganisms that live in the gastrointestinal system. The composition and diversity of the gut microbiota are important variables in the development of IBD. We studied the impact of germ-free status on the progression of the inflammatory process in an experimental model of IBD using mice with and without mucin-2 (MUC2) gene knockout.

Inflammatory bowel disease (IBD) has been a global healthcare problem with a sustained increasing incidence. It includes two major forms, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) [1]. According to the studies gut microbiota is approximately 100 billion bacteria which adapted to symbiotic life on the intestinal mucosal surface and play a critical role in host nutrition and immunomodulation. Imbalance or dysbiosis can lead to the development of diseases, including IBD. Muc2^{-/-} mice are used as experimental model of IBD. The intestinal mucus layer is formed of glycosylated biopolymers MUC2. Depletion of the mucus layer is one of the most common characteristics in IBD patients, allowing gut microbial components to come in close contact with host cells and to elicit unregulated inflammation [2]. Also, germ-free mice models are frequently considered as the gold standard for microbiota studies [3]. Thus, we decided to use Muc2^{-/-} germ-free mice in our experiment and compare them to the those of SPF status mice (with normal microbiota, but without specific species of pathogens). In results to be able that whether mucus layer without microbiota is a cause of the inflammation and could lead to IBD or not.

Since there is no breeding of germ-free mice in Russia, we decided to breed these mice by a new method. Muc2^{-/-} and Muc2^{+/+} germ-free mice were successfully developed. Analyzed the bacterial DNA using 16s rRNA expression by real-time PCR following by gel electrophoresis that to demonstrate the germ-freeness of the mice's intestines. For this purpose, bacterial culture method of the intestinal contents was also used. Flow cytometry was used to study the spleen and blood lymphocytes. In addition, multiplex analysis was used to profile the cytokine levels of distal colon.

The real-time PCR method revealed no detection of any 16s rRNA in feces, as well as no growth under both aerobic and anaerobic conditions in the bacterial culture method of germ-free mice. However, the bacterial culture for the SPF group revealed that anaerobic bacteria are much greater in Muc2^{-/-} mice than in wild-type mice.

Factor analysis of the percentage of B and T cells showed that the interaction of factors genotype and microbial state had a significant effect on the percentage of B and T cells. Converting the status to germ-free, the difference in the percentages of B and T cells between Muc2^{+/+} and Muc2^{-/-} mice levels off due to an increase in B cells and a decrease in T cells in Muc2^{-/-}. The percentage of CD4CD25 was significantly affected by mice genotype and interaction with presenting of microbiota. Germ-free Muc2^{-/-} mice decreased of CD4CD25 cells in the blood to comparison with SPF Muc2^{-/-} mice.

The percentage of T and B splenocytes depend only from presenting of microbiota but not genotypes and interaction factors. In germ-free mice, the percentage of CD3 splenocytes decreases, while the percentage of CD19 increases. The percentage of T killers and T helpers of the spleen did not depend from genotype or microbial state. Interestingly that the percentage of CD25-positive T cells in the spleen, as well as in the blood, depended on the genotype and presenting of microbiota. In SPF Muc2^{-/-} mice, the percentage of T regulatory cells was significantly higher compared to the wild type, while in germ-free mice it significantly decreases and ceases to differ from Muc2^{+/+} mice.

In Muc2^{-/-} mice with normal intestinal microbiota, the percentage of immunoregulatory cells was lower than in wild type, but microbial-freeness significantly reduced it in wild-type mice and the difference between genotypes disappeared. The percentage of colitogenic cells was higher in Muc2^{-/-} mice with normal microbiota intestine, the absence of microbiota in the intestine caused a significant and very strong decrease in these cells in Muc2^{-/-} mice.

Factor analysis of the cytokine profile showed a significant effect of genotype and microbial status. SPF mice have been shown that the expression of pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL1b, IL6) was increased in Muc2^{-/-} mice, and in

*The work was carried out under the supervision of Dr. E.A. Litvinova in the department of psychoneuroimmunology of the Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine with the support of the Russian Science Foundation grant 20-64-47020.

germ-free Muc2^{-/-} mice, the expression of pro-inflammatory cytokines (IL5, IL12B) was lower compared to wild-type mice. Also, when comparing of SPF status and germ-free Muc2^{-/-} mice, an increase in pro-inflammatory IL2 and a decrease in the anti-inflammatory cytokine IL10 were noted in conditionally germ-free mice.

References

1. Britton G. J., Contijoch E. J., Mogno I. et al. Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t⁺ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice // *Immunity*. 2019 Jan 15. Vol. 50(1). P. 212–224. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30650377/>
2. Leon-Coria A., Kumar M., Workentine M. et al. Muc2 Mucin and Nonmucin Microbiota Confer Distinct Innate Host Defense in Disease Susceptibility and Colonic Injury // *Cell. Mol. Gastroenterol Hepatol*. 2021. Vol. 11(1). P. 77–98. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32659381/>
3. Kennedy E.A., King K.Y., Baldrige M.T. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria // *Front Physiol*. 2018 Oct 31. Vol. 9. P. 1534. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30429801/>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-281

**FACTOR HPF1 REGULATES THE ACTIVITY OF POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASES 1 AND 2
AND THE FORMATION OF POLY(ADP-RIBOSE)-CONTAINING COMPARTMENTS
WITH THE PARTICIPATION OF THE RNA-BINDING PROTEIN FUS**

A. S. Singatulina, M. V. Sukhanova, O. I. Lavrik

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ lasty@ngs.ru

Abstract

Poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 (PARP1/2) synthesize poly(ADP-ribose) (PAR) by covalently modifying a number of proteins involved in DNA/RNA metabolism, including themselves. PARP1/2 are key regulators of DNA repair via autopoly(ADP-ribosylation) at the site of DNA damage. The study of factors that modulate PARP1/2 activity in response to genotoxic stress is an important task in modern biology.

An efficient and specific PARylation seems to play an important role in attracting protein factors to DNA damage sites and formation of repair compartments, including PAR and PAR-binding proteins [1]. However, the possibility of PARP2 and other factor regulating PARP1/2 activity to participate in the formation of the compartments has not been studied yet.

Recently, a novel histone PARylation factor 1 (HPF1) has been discovered. HPF1 was shown to modulate PARP1/2 activity by forming a transient joint active site with PARP1/2. The overall mechanism of interaction between HPF1 and PARP1/2 is currently under intense investigation. HPF1 switches PARP1/2 catalyzed PARylation to serine residues from another amino acid residues. Interestingly, PARP1/2 interaction with HPF1 also leads to the formation of shorter PAR polymers [2]. Structural and biochemical analysis of the PARP1/2 complex with HPF1 have shown that HPF1 blocks the histidine residues (His826 and His381) responsible for catalysis of polymer elongation in the active sites of PARP1 and PARP2, respectively, and thereby prevents PAR elongation [3].

The study of the effect of HPF1 on the length and amounts of PAR is of a great interest due to both the possible change in the spectrum of PARylated proteins and their modification sites. The length and amounts of PAR seem to regulate the formation DNA-PAR compartments and its protein composition. It is possible that the regulation of the properties and composition of the PAR-dependent compartments makes possible to coordinate DNA repair more precisely and more specifically.

In our previous studies we have shown by atomic force microscopy (AFM) the local recruitment of intrinsically disordered RNA-binding protein FUS (Fused in sarcoma) to PAR synthesized by PARP-1 at damaged DNA sites [4]. Importantly, we also found that FUS then triggers the formation of large compartments in which damaged DNA is enriched. FUS, thus, generates dynamic compartments in which damaged DNA accumulates, which can facilitate the recognition of damaged DNA by DNA repair factors due to the relative decrease in undamaged DNA concentration within the compartments. Compartmentalisation of damaged DNA cannot be fulfilled by PAR alone, due to its inability to self-attracting, but FUS is able to carry out the multivalent interactions between PAR through LCD (low complexity domain) and RGG (arginine, glycine-rich) motifs.

Since the properties of the proteins attracted to the PAR-dependent compartments play a decisive role in their formation, one should not exclude the importance of the structure of the PAR itself, its length and amount, which, as it turned out, can be significantly regulated by HPF1.

We conducted a series of experiments using AFM for analysis size and number of compartments formed with participation of FUS after PARylation of PARP1/2 in the absence or presence of HPF1. We found a decrease in the size of the PAR synthesized by both PARP1 and PARP2 during their automodification in the presence of HPF1. For the first time, we showed that activated PARP2 is also able to form PAR-DNA rich compartments in the presence of FUS. Using biochemical methods, we have shown that not only the size, but also the amount of PAR synthesized by PARP1 and 2 decreases with an increase in the concentration of HPF1, respectively. Using AFM, we also observed that an increase in the concentration of HPF1 led to a decrease in the size of the emerging compartments, but at the same time, the number of the compartments remained at a similar level.

These results showed an inhibitory effect of HPF1 on PAR synthesis and formation of compartment containing FUS, PAR and damaged DNA which in turn provides a field for further investigation of this effect on DNA repair and cell survival under genotoxic stress in connection with the search for PARP inhibitors used to treat diseases such as cancer and others.

References

1. Alemasova E. E., Lavrik O. I. A sePARate phase? Poly (ADP-ribose) versus RNA in the organization of biomolecular condensates // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. P. 10817-10838.
2. Kurgina T. A., Moor N. A., Kutuzov M. M., Lavrik O. I. The HPF1-dependent histone PARylation catalyzed by PARP2 is specifically stimulated by an incised AP site-containing BER DNA intermediate // *DNA repair*. 2022. V. 120. P. 103423.
3. Suskiewicz J., Munnur D., Strømmland Ø., Yang J. C., Easton L. E., Chatrin C., Kang Z., Bareti D., Schuller M., Wu, W. F., Elkins, J. M. Updated protein domain annotation of the PARP protein family sheds new light on biological function // *Nucleic Acids Research*. 2023.
4. Singatulina A. S., Hamon L., Sukhanova M. V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O. I., Pastré D. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA // *Cell reports*. 2019. V. 27. P. 1809-1821.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-282

ANALYSIS OF THE GENOMES OF DOMESTIC PIGS *SUS SCROFA DOMESTICUS* OF THE DUROC BREED IN ORDER TO IDENTIFY BREED-SPECIFIC SNP *

E. V. Snytkov, V. N. Kipen, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko

Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus, Minsk

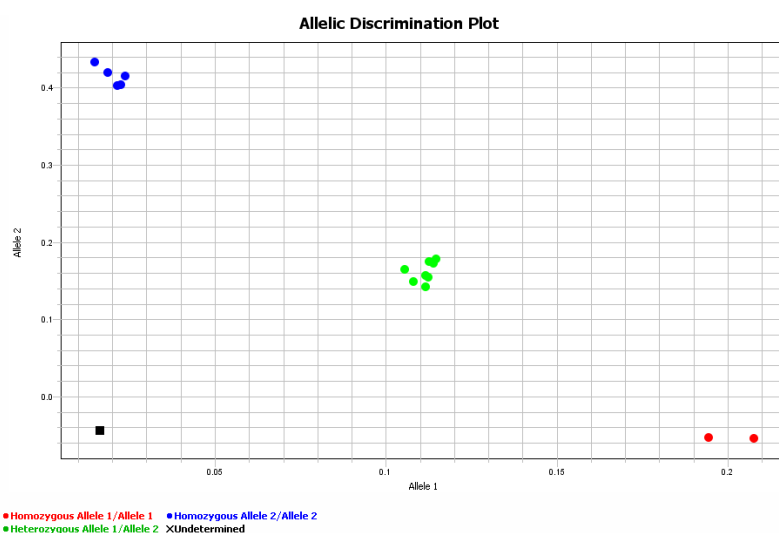
✉ evsnytkov@gmail.com, v.kipen@igc.by

Abstract

Using bioinformatics methods, the analysis of the genomes (SRA) of animals of the *Sus scrofa* species of the Duroc, Landrace, Pietrain, Yorkshire was carried out, as a result of which polymorphisms (SNPs) with a significant differentiating potential for the Duroc breed were identified. Genotyping of biological samples was carried out in order to confirm the results obtained.

An urgent task is the differentiation of biological samples belonging to individuals of different breeds of the *Sus scrofa* species, according to single nucleotide polymorphisms (SNPs). Genomic selection is more accurate and has been developed for purebred populations of many agricultural species [1, 2]. The development of the methodological and material base of molecular genetic methods and, as a result, the reduction in the cost and labor intensity of such studies led to the complete transition of breed associations in a number of countries (USA, Canada, Germany, etc.) to the use of DNA analysis, which significantly increases the accuracy of the breeding process. In addition, DNA banks created in parallel are the basis for genetic monitoring of breeds and populations, as well as research on the identification and implementation of marker selection technologies [3].

Genotyping of biological samples was carried out using the technology of kompetitive allele specific PCR (KASP). Genotyping was performed using KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) and KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, UK; LLC Maxim Medical, Russia) in duplicate. PCR was performed in a volume of 10 μ l in QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System according to the available KASP recommendations. Figure 1 shows an example of allelic discrimination.



Allelic discrimination obtained as a result of genotyping using KASP technology for SNP AX-116690009

We have genotyped 155 *Sus scrofa domesticus* animals of the Duroc, Landrace, Yorkshire, Belarusian Large White and Belarusian meat breeds at 10 SNP: AX-116232649, AX-116346555, AX-116690009, AX-116345721, AX-116373505, AX-116379068, AX-116398658, AX-116517890, AX-116519343 and AX-116635865 [4]. Based on the ROC analysis for breed discrimination, SNPs with a high differentiating potential were identified. The greatest differentiating potential

* The study was carried out as part of the research work "Development of a genetic analysis system for determining the purity of pigs based on the study of SNP loci", the State Scientific Research Program "Biotechnology-2", subprogram "Genomics, epigenomics, bioinformatics" for 2021–2025.

(both through confirmatory alleles, i.e. specific to Duroc pigs, and through exclusion alleles, i.e. specific to other breeds in the study) for distinguishing Duroc pigs from other breeds, was found to be SNP AX-116346555 and AX-116690009.

Whith using the logistic regression, the genotypes are able to unambiguously differentiate which group the unknown sample belongs to. As a result of multiple permutations of the primary data, the entropy level for each SNP for the Duroc breed was determined. The model included 2 SNPs: AX-116346555 and AX-116690009. The accuracy of the model was 98.1%, (-2 Log Likelihood — 15.652, Cox and Snell R squared — 0.4142, Nagelkirk R squared — 0.8804).

References

1. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges / B J Hayes [et al.] // Journal of dairy science. 2009. Vol. 92 (2). P. 433–443.
2. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing / A. M. Ramos [et al.] // Anim. Genet. 2011. Vol. 42 (6). P. 613–620. DOI:10.1111/j.1365-2052.2011.02198.x
3. A genome-wide association study for a proxy of intermuscular fat level in the Italian Large White breed identifies genomic regions affecting an important quality parameter for dry-cured hams / L. Fontanesi [et al.] // Anim. Genet. 2017. Vol. 48 (4). P. 459–465. DOI: 10.1111/age.12542
4. Breed differentiation of domestic pigs using SNP extended bioinformatical analysis / V. N. Kipen, E. V. Snytkov, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus. 2022. V. 66(3). pp. 301–309. DOI:10.29235/1561-8323-2022-66-3-301-309

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-283

DETERMINATION OF BREED-SPECIFIC SNPS OF LANDRACE PIGS USING BIOINFORMATICS AND KASP-GENOTYPING METHODS*

E. V. Snytkov, V. N. Kipen, M. E. Mikhailova, R. I. Sheyko

Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus, Minsk

✉ evsnytkov@gmail.com, v.kipen@igc.by

Abstract

Using the analysis of genomes (SRA) of animals of the *Sus scrofa* species of the Duroc, Landrace, Pietrain, Yorkshire breeds, we identified polymorphisms (SNP) with a significant differentiating potential for the Landrace breed, after which we performed KASP-genotyping of biological samples to confirm the results.

Determining the purity of farm animals in the breeding system is of key importance for the entire livestock industry. In view of the fact that quantitative traits, as a rule, have a polygenic nature of inheritance, i.e. are determined by a combination of genes and their functional state, the determination of significant correlations between SNP and phenotypic trait(s) at a high level of statistical significance is feasible only with genome-wide studies — GWAS.

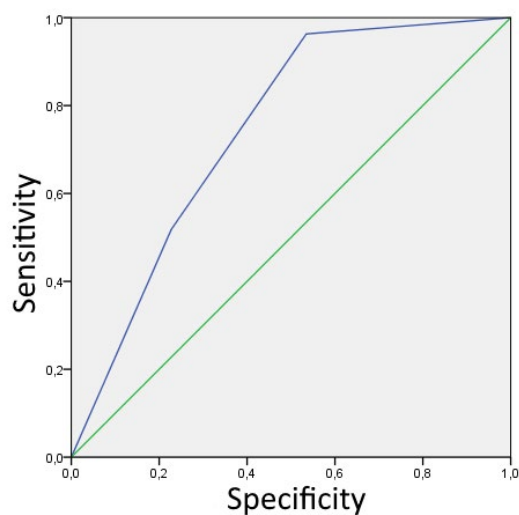
Taking into account the fact that GWAS are carried out using microarray technologies, the identified genetic associations at the genome level should be additionally verified in further subpopulation studies. The GWAS results, first of all, are aimed at identifying the search area in the genome for the researcher to identify loci (genes) with a high differentiating potential in order to solve the problem. In this regard, the priority task for bioinformatics researchers is to determine the SNPs located near genetic markers, the differentiating potential of which was previously determined.

The skin epithelium acted as a source of DNA; DNA was isolated from ear tweezers. DNA amplification was carried out using KASP Assay mix (KASP by Design, KBD) and KASP Master mix (LGC Biosearch Technologies, UK; LLC Maxim Medical, Russia) in duplicate. PCR was performed in a volume of 10 µl in QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System according to the available KASP recommendations.

We have genotyped 155 *Sus scrofa domestica* animals of the Duroc, Landrace, Yorkshire, Belarusian Large White and Belarusian meat breeds at 10 SNP: AX-116232649, AX-116346555, AX-116690009, AX-116345721, AX-116373505, AX-116379068, AX-116398658, AX-116517890, AX-116519343 and AX-116635865 [1]. Based on the ROC analysis for breed discrimination, SNPs with a high differentiating potential were identified. The greatest differentiating potential (both through confirmatory alleles, i.e. specific to Landrace pigs, and through exclusion alleles, i.e. specific to other breeds in the study) for distinguishing Landrace pigs from other breeds, was found to be SNP AX-116379068 (see Figure).

The value AUC was 0.743 (SD=0.039), p-level 6.36E-07. Lower limit 95% CI for AUC was 0.667, upper limit 95% CI was 0.820.

Thus, on the basis of practical material, a significant differentiating potential of SNP AX-116379068 for differentiating Landrace pigs in Belarus has been proved. In the future, other SNPs with a high potential according to bioinformatics analysis data will be tested.



ROC-curve for SNP AX-116379068

References

1. Breed differentiation of domestic pigs using SNP — extended bioinformatical analysis / V.N. Kipen, E.V. Snytkov, M.E. Mikhailova, R.I. Sheyko // Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus. 2022. V.66(3). pp. 301–309. DOI: 10.29235/1561-8323-2022-66-3-301-309

*The study was carried out as part of the research work “Development of a genetic analysis system for determining the purity of pigs based on the study of SNP loci”, the State Scientific Research Program “Biotechnology-2”, subprogram “Genomics, epigenomics, bioinformatics” for 2021–2025.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-284

**ВЛИЯНИЕ IL-15 И TGF β НА ФЕНОТИП НК-КЛЕТОК
В СОСТАВЕ 3D-МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*****INFLUENCE OF IL-15 AND TGF β ON THE PHENOTYPE OF NK CELLS
WITHIN THE 3D-MODEL OF BREAST CANCER**М. М. Абдурахманова¹, А. А. Леонтьева^{1,2}, А. А. Юрина^{2,3}, Т. Н. Беловежец³,
С. В. Кулемзин³, Е. В. Кулигина¹, В. А. Рихтер¹, А. А. Нуштаева¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университет³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, НовосибирскM. M. Abdurakhmanova¹, A. A. Leontieva^{1,2}, A. A. Yurina^{2,3}, T. N. Belovezhets³,
S. V. Kulemzin³, E. V. Kuligina¹, V. A. Richter¹, A. A. Nushtaeva¹¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University³Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

✉ m.abdurakhmanova98@gmail.com

Аннотация

Иммунотерапия НК-клетками является перспективным подходом для лечения солидных опухолей. При разработке такого подхода необходимо учитывать опухолевое микроокружение. Клеточные 3D-модели представляют собой физиологически релевантную модель для оценки эффективности иммунотерапии *in vitro*. Цель исследования: оценить трансформацию фенотипа первичных НК-клеток, полученных от здорового донора, в составе 3D-моделей РМЖ при стимуляции IL-15 или TGF β .

Abstract

NK-cell immunotherapy is a promising approach for the treatment of solid tumors. When developing such an approach, the tumor microenvironment must be taken into account. 3D cell models, represent a physiologically relevant model to evaluate the efficacy of immunotherapy *in vitro*. The aim of the study: to evaluate the phenotype transformation of primary NK cells derived from a healthy donor in 3D models of breast cancer upon IL-15 or TGF β stimulation.

Рак молочной железы (РМЖ) — распространенное онкологическое заболевание среди женщин. Новые подходы для лечения различных злокачественных новообразований нацелены на усиление противоопухолевого иммунного ответа. Микроокружение опухоли влияет на инфильтрацию и фенотип иммунных клеток и может способствовать ускользанию клеток опухоли от иммунного ответа.

Для оценки эффективности терапевтических подходов необходимы клеточные модели, которые максимально отражают сложность опухоли как объекта. Клеточные 3D-модели, состоящие из опухолевых и стромальных клеток, представляют собой физиологически релевантные модели для оценки эффективности иммунотерапии.

Цель исследования: оценить трансформацию фенотипа первичных НК-клеток, полученных от здорового донора (PB-NK), в составе 3D-моделей РМЖ при стимуляции IL-15 или TGF β .

На первом этапе были сконструированы 3D-модели, состоящие только из опухолевых (3De), только из стромальных (3Df) клеток, а также из совместно культивируемых опухолевых и стромальных клеток (3D-2). Далее к 3D и 3D-2 были добавлены PB-NK-клетки (3D-3). В качестве опухолевого компонента моделей использовали клетки гормон-зависимой линии MCF7, а в качестве стромального — опухолевые (BrC120f), опухоль-ассоциированные (ОАФ, BrC4f) и нормальные (BN120f) фибробласты. Клетки 3D и 3D-2 были получены в среде DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов с использованием неадгезивных планшетов. Через 48 часов к 3D и 3D-2 были добавлены PB-NK-клетки в соотношении 1:1. IL-15 или TGF β добавляли одновременно с PB-NK.

Известно, что CD56^{bright} НК-клетки продуцируют противовоспалительные цитокины, а CD56^{dim} представляют собой цитотоксическую субпопуляцию [1]. При добавлении PB-NK-клеток к 3D-2 происходит незначительное увеличение популяции CD56^{bright} НК-клеток вне зависимости от типа фибробластов в составе 3D-2 в отличие

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 20-74-10039.

от 3De из MCF7. При добавлении IL-15 происходит увеличение клеток CD56⁺, а при стимуляции TGF β — снижение общего количества клеток CD56⁺ для всех экспериментальных моделей.

При сокультивировании 3Df и PB-NK-клеток количество CD56^{bright} NK-клеток изменяется в ряду: ОАФ BrC4f > опухолевые BrC120f > здоровые BN120f. Стимуляция IL-15 значительно увеличивает количество CD56^{bright} NK-клеток при их сокультивировании с 3Df из ОАФ. При сокультивировании NK-клеток с 3Df из BN120f уменьшается общая популяция CD56⁺ NK-клеток. Добавление TGF β способствует уменьшению количества CD56⁺ NK-клеток при их сокультивировании с 3Df из BrC120f, а при их сокультивировании с 3Df из BN120f — увеличению количества CD56^{dim}. Стимуляция TGF β повышала процент CD56^{bright} NK-клеток при их сокультивировании с 3Df из ОАФ.

Использованные в работе NK-клетки были описаны нами как CD56^{dim}, поэтому далее мы оценивали профиль рецепторов CD57, KIR и CD62L PB-NK-клеток в составе 3D-3. Способность CD56^{bright} NK-клеток реагировать на стимуляцию цитокинами коррелирует с экспрессией CD62L или CD57. А «киллерная» активность субпопуляций CD56^{dim} и способность продуцировать IFN- γ коррелирует с экспрессией собственных ингибирующих рецепторов, принадлежащих к семейству KIR [2].

Сокультивирование PB-NK с 3D-2, в которых ОАФ выступают в качестве стромального компонента, способствует увеличению процента CD57⁺ NK-клеток. Стимуляция как IL-15, так и TGF β способствует увеличению процента CD57⁺ PB-NK при их сокультивировании с 3Df из ОАФ. Стимуляция TGF β снижает процент CD57⁺ PB-NK при их сокультивировании с 3Df как из BrC120f, так и из BN120f.

Процент CD62L⁺ PB-NK незначительно снижается при стимуляции как IL-15, так и TGF β при их сокультивировании с 3D-2 вне зависимости от типа фибробластов, а при их сокультивировании с 3De из MCF7 — незначительно повышается. Стимуляция как IL-15, так и TGF β значительно увеличивает процент CD62L⁺ NK клеток при их сокультивировании с 3Df из ОАФ, а с 3Df из BrC120f и BN120f — снижает.

При оценке изменения активации рецепторов KIR наблюдалась тенденция увеличения уровня KIR⁺ PB-NK при их сокультивировании с 3De только из MCF7 по сравнению с контролем без стимуляции.

Таким образом, показано, что стимуляция IL-15 или TGF β приводит к изменению фенотипа NK-клеток и может способствовать повышению их цитотоксической активности.

Литература

1. Long E. O. et al. Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. Vol. 31, № 1. P. 227–258.
2. Luetke-Eversloh M. et al. NK cells gain higher IFN- γ competence during terminal differentiation: Innate immunity // *Eur. J. Immunol.* 2014. Vol. 44, № 7. P. 2074–2084.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-285

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ*****PROSPECTS FOR THE APPLYING OF CELL-FREE DNA AND DEOXYRIBONUCLEASES
FOR THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF ONCOLOGICAL DISEASES**

Л. А. Алексеева

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

A. A. Alekseeva

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ mila_alex@ngs.ru

Аннотация

Для изучения опухолевой прогрессии исследуют состав циркулирующей опухолеассоциированной внеклеточной ДНК и данную ДНК в составе нейтрофильных ловушек. Такая внеклеточная ДНК может обладать патологическими эффектами, приводя к усилению онкогенеза и метастазирования. Для ее разрушения применяют дезоксирибонуклеазы, имеющие большой потенциал в качестве противоопухолевых агентов.

Abstract

To investigate tumor progression, the characteristics of circulating tumor-associated cell-free DNA (cfDNA) and cfDNA in neutrophil traps (NETs) is examined. Such cfDNA may have pathological effects, leading to increased oncogenesis and metastasis. For cfDNA clearance, deoxyribonucleases (DNases) are used, which have great potential as antitumor agents.

Внеклеточная циркулирующая ДНК (внДНК) является активно исследуемым объектом и представляет интерес в качестве жидкостной биопсии для ранней диагностики и прогноза течения различных заболеваний. Все чаще предлагаются варианты использования жидкостной биопсии для молекулярного профилирования рака, что позволяет использовать прецизионный подход к онкологии. Для диагностики предлагается использовать анализ онкоспецифических характеристик внДНК: мутантных последовательностей, характерных для опухолевых клеток (KRAS, P53 и др.), переамплифицированных последовательностей (MYS, мобильные генетические элементы (МГЭ)), участков нестабильности генома (GIN), паттернов изменения метилирования и т.д. Динамика изменений в пуле внДНК может также применяться для прогнозирования ответа на блокаду иммунных контрольных точек, а также для прогнозирования ответа и резистентности на ранней стадии после терапии. Немаловажной частью жидкой биопсии для диагностики и прогноза может быть анализ нейтрофильных ловушек (NETs), плотность которых возрастает при развитии онкологических заболеваний.

Состав циркулирующей внДНК в крови онкологических больных поднимает вопрос о возможной роли внДНК в канцерогенезе. Согласно генометастатической гипотезе метастазы могут возникать путем проникновения в уязвимые клетки, расположенные в органах-мишенях, опухолеспецифической внДНК из клеток первичной опухоли, например, содержащей МГЭ или фрагменты онкогенов. Открытие ДНК-содержащих внеклеточных везикул и данные, демонстрирующие горизонтальный перенос ДНК между различными клетками *in vitro* и организмами, укрепили эту гипотезу.

NETs, составляющие значительную часть пула внДНК при некоторых типах рака, также могут вносить вклад в развитие онкологических заболеваний. Так, NETs могут активировать спящие опухолевые клетки, усиливать пролиферативные и адгезивные способности клеток первичной опухоли, а также способствовать метастазированию, захватывая опухолевые клетки в кровотоки и стимулируя циркулирующие опухолевые клетки, а также участвуют в формировании опухолевого микроокружения и премегастатических ниш. В некоторых случаях избыточное образование NETs позволяет опухоли избежать иммунного надзора. Из-за потенциальной опасности, которую представляют для организма персистирующие внДНК и NETs, удаление внДНК опухолевого происхождения из кровообращения является важным для гомеостаза.

На уровень внДНК заметно влияют внутриклеточные нуклеазы, участвующие в распаде ДНК при апоптозе, некрозе и других видах гибели клеток. В норме внутриклеточные и секреторные ДНКазы работают сочетанно,

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-14-00289.

© Л. А. Алексеева, 2023

и дефицит той или иной ДНКазы может быть компенсирован действием других ферментов. Тем не менее при патологических состояниях нормальное функционирование ДНКаз нарушается, а в клетках опухолей и опухолевого микроокружения могут накапливаться мутации в различных генах, что препятствует нормальной экспрессии ДНКаз или их ингибиторов. У онкологических пациентов выявлено понижение суммарной ДНКазной активности крови, что свидетельствует об изменении экспрессии секретируемых ДНКаз.

Принимая во внимание патологическую роль циркулирующих внДНК в канцерогенезе, в настоящее время ведется разработка новых противоопухолевых и антиметастатических препаратов на основе ДНКаз. На мышинных моделях опухолей показан антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I. Для этого фермента также показано эффективное разрушение NETs. Рекombинантная ДНКазы I человека продемонстрировала высокую антиметастатическую активность в форме ингаляционного препарата «Пульмозим» и онконаправленного вектора, содержащего ген активной рекombинантной ДНКазы. В целом ДНКазы I может быть предложена в качестве нового эффективного препарата для лечения заболеваний, связанных с избыточным высвобождением патологической внДНК, NETs, а также вирусной и бактериальной ДНК, и является перспективным антиметастатическим препаратом для широкого спектра опухолей.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-286

**ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ С TCR-ПОДОБНЫМ
CAR-МОДИФИЦИРОВАННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, СПЕЦИФИЧНЫМ К MAGE-A4 *IN VITRO******EXPLORING TCR-LIKE CAR-ENGINEERED LYMPHOCYTE CYTOTOXICITY
AGAINST MAGE-A4 *IN VITRO***

А. Алсаллум^{1,2}, Ю. А. Шевченко¹, М. С. Фишер¹, Ю. Г. Филиппова¹, Р. Ю. Перик-Заводский¹,
О. Ю. Перик-Заводская¹, С. Алрхмун^{1,2}, Ю. А. Лопатникова¹, В. В. Курилин¹, М. Вольнец¹,
Я. Акахори³, Х. Шику³, А. Н. Силков¹, С. В. Сенников^{1,2}

¹НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет

³Университет Мие, Цу, Япония

A. Alsalloum^{1,2}, Yu. Shevchenko¹, M. Fisher¹, Yu. Philippova¹, R. Perik-Zavodskii¹, O. Perik-Zavodskaya¹,
S. Alrhoun^{1,2}, Yu. Lopatnikova¹, V. Kurilin¹, M. Volynets^{1,2}, Y. Akahori³, H. Shiku³, A. Silkov¹, S. Sennikov¹

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

²Novosibirsk State University

³Department of Personalized Cancer Immunotherapy, Mie University Graduate School of Medicine, Japan

✉ alaa.alsalloum19996@gmail.com

Аннотация

Развитие лимфоцитов с TCR-подобным CAR-рецептором, который распознает эпитопы антигенов, ассоциированных с опухолью, в сочетании с МНС открывает широкий спектр потенциальных антигенов-мишеней любой клеточной локализации, особенно в солидных опухолях, обладающих идеальными внутриклеточными антигенами. В нашем исследовании мы изучали цитотоксичность и функциональные особенности Т-лимфоцитов, сгенерированных *in vitro* с TCR-подобным CAR-рецептором, специфичным к MAGE-A4.

Abstract

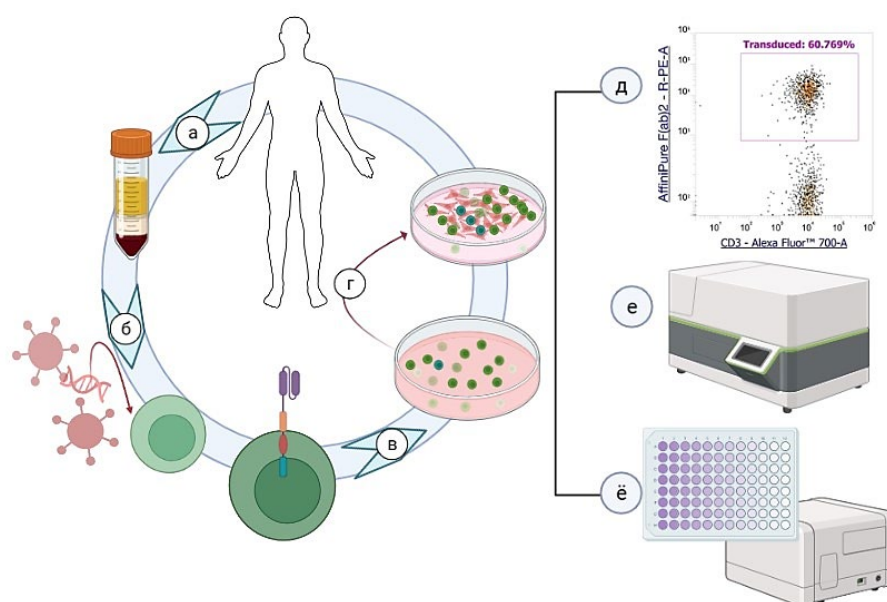
The development of T-lymphocytes with a TCR-like CAR receptor, recognizing antigens associated with tumors in conjunction with МНС, opens up a wide range of potential antigen targets in various cellular localizations, particularly in solid tumors with ideal intracellular antigens. In our study, we investigated the cytotoxicity and functional characteristics of *in vitro* generated T-lymphocytes with a TCR-like CAR receptor specific to MAGE-A4.

MAGE-A4 представляет собой раковый эмбриональный антиген с ограниченной экспрессией в нормальных условиях. Однако высокий уровень MAGE-A4 обнаружен в различных злокачественных опухолях, что делает его перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Существующие методы таргетирования MAGE-A4 оказались недостаточно эффективными [1, 2], поэтому разрабатываемая в лаборатории терапия имеет большую важность. В данном исследовании Т-клетки были модифицированы с помощью вирусной трансдукции для экспрессии TCR-подобного CAR-рецептора (см. рисунок). После совместного культивирования трансдуцированных Т-клеток с опухолевыми клетками-мишенями был проведен анализ их фенотипа с использованием проточной цитометрии. Иммунное транскриптомное профилирование осуществлялось с помощью платформы NanoString sprint. Цитотоксический потенциал был количественно измерен с использованием колориметрического анализа. Также была оценена продукция цитокинов с помощью мультиплексного анализа.

В ходе работы был установлен антигенспецифический цитотоксический ответ в отношении линий клеток, экспрессирующих целевой антиген (NW-Mel-38 и SK-Mel-37), по сравнению с MAGEA4-негативной линией (HCT-116). Также было замечено значительное увеличение доли клеток, экспрессирующих CD8, CD69, CD107a и FasL, приблизительно на 68.47 ± 3.041 %. Профилирование иммунного транскриптома полученных Т-клеток показало увеличение экспрессии ключевых генов Т-эффекторов, таких как GZMB и IFNG, а также значительное увеличение экспрессии хемокинов, таких как CCL4 и CXCL1. Кроме того, была продемонстрирована активация путей, связанных с регуляцией клеточной пролиферации. Мультиплексный анализ показал значительное

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 21-65-00004.

© А. Алсаллум, Ю. А. Шевченко, М. С. Фишер, Ю. Г. Филиппова, Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, С. Алрхмун, Ю. А. Лопатникова, В. В. Курилин, М. Вольнец, Я. Акахори, Х. Шику, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2023



Технологическая карта эксперимента: *a* — выделение Т-клеток; *б* — трансдукция Т-клеток с использованием ретровируса; *в* — экспансия трансдуцированных Т-клеток; *г* — инкубация Т-клеток с опухолевыми клетками-мишенями; *д* — фенотип трансдуцированных Т-клеток; *е* — иммунное транскриптомное профилирование; *ё* — цитотоксический потенциал

увеличение цитотоксичности Т-клеток, опосредованной цитокинами, в пути апоптоза клеток-мишеней, таких как гранзимы и sFasL. Также было обнаружено значительное повышение уровня цитокинов, таких как IFNG и TNF α , которые участвуют в регулировании воспалительного ответа, по сравнению с нетрансдуцированными Т-лимфоцитами. Таким образом, полученные лимфоциты с TCR-подобным CAR, специфичным к MAGE-A4, демонстрируют способность клеток к противоопухолевой реактивности и могут быть рекомендованы для дальнейших исследований данного типа клеток *in vivo*.

Литература

1. Alsalloum, A., Shevchenko, J.A., Sennikov S. The Melanoma-Associated Antigen Family A (MAGE-A): A Promising Target for Cancer Immunotherapy? // *Cancers*. 2023. Vol. 15. P. 1779. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/6/1779>
2. Zajac P., Schultz-Thater E., Tornillo L. et al. MAGE-A Antigens and Cancer Immunotherapy // *Front. Med.* 2017. Vol. 4. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28337438/>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-287

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПАТОЛОГИЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ НАПРАВЛЕННОГО УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОГО ПРОТЕОЛИЗА
БЕЛКОВЫХ МИШЕНЕЙ PROTAC (PROTEOLYSIS TARGETING CHIMERAS)***

**MOLECULAR THERAPY OF NEURODEGENERATIVE PATHOLOGIES USING TARGETED
UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEOLYSIS OF PROTEIN TARGETS WITH PROTACS
(PROTEOLYSIS TARGETING CHIMERAS)**

М. И. Антипина, Е. Г. Чупахин, В. В. Какоткин, М. А. Агапов, Е. В. Семина

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

M. I. Antipina, E. G. Chupakhin, V. V. Kakotkin, M. A. Agapov, E. V. Semina

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

✉ antipinaria@gmail.com

Аннотация

Накопление агрегатов ассоциированного с микротрубочками тау-белка (МАРТ) вследствие его гиперфосфорилирования является отличительной чертой при болезни Альцгеймера (БА). Поэтому нацеливание на МАРТ является одним из перспективных подходов для терапии БА. Одним из вариантов возможной терапии нейродегенеративных заболеваний является система PROTAC (Proteolysis Targeting Chimeras), используемая для селективной деградации целевого белка в клетке.

Abstract

Aggregation of microtubule-associated tau protein (МАРТ) due to its hyperphosphorylation is a hallmark of Alzheimer's disease (AD). Therefore, targeting MART is one of the promising approaches for AD therapy. PROTAC (Proteolysis Targeting Chimeras) system is one of the possible therapy options for neurodegenerative diseases, which is used to selectively degrade a target protein in a cell.

На сегодняшний день актуальной проблемой современной медицины является терапия болезни Альцгеймера — прогрессирующего нейродегенеративного расстройства, связанного с ухудшением когнитивных способностей. Патологическими признаками заболевания считается накопление β -амилоидного пептида ($A\beta$) и ассоциированного с микротрубочками тау-белка в нейронах. Хотя в настоящее время проводится множество клинических исследований, оценивающих эффективность воздействия на $A\beta$, есть обоснованные опасения, что его деградация может быть недостаточна. Кроме того, ряд исследователей высказывает обоснованное мнение о том, что накопление $A\beta$ в нейронах скорее следствие патологического процесса, а не его причина. При этом дисфункции МАРТ вследствие накопления или мутаций достаточно, чтобы вызвать нейродегенерацию в отсутствие патогенного $A\beta$. Следовательно, разработка терапевтических подходов, направленных на МАРТ, является перспективным направлением как для лечения БА, так и других таупатий.

Направленный протеолиз белков-мишеней, связанных с нейродегенеративными процессами, является эффективной стратегией терапии когнитивных заболеваний. Малые молекулы, синтезированные с использованием подхода PROTAC, обеспечивают направленное взаимодействие целевых белков с убиквитином, что позволяет стимулировать их протеолиз и снижение накопления в нейронах. Полученные соединения будут востребованы фармацевтической промышленностью как новые лекарственные препараты для терапии нейродегенеративных заболеваний.

Целью текущего исследования является разработка и синтез новых химических соединений PROTAC системы для направленного убиквитин-зависимого протеолиза тау-белка как мишень при терапии болезни Альцгеймера. На данный момент проведен критический этап исследования — молекулярный докинг библиотеки лигандов к МАРТ. По результатам первичного докинга из 900 веществ было отобрано 120 соединений с наименьшей энергией связывания. После список молекул-кандидатов был сокращен после проведения ADME и Membrane Permeability тестов, которые позволили отобрать соединения с подходящими фармакокинетическими и физическими свойствами. Таким образом получена библиотека молекул-кандидатов из 30 соединений, направленных

* Данное исследование было поддержано из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. Канта.

ных на убиквитин-зависимый протеолиз тау-белка. Однако при разработке подхода к терапии БА стоит учесть, что патологичным является не сам МАРТ, а его агрегаты или нейрофибрилярные клубки, которые образуются вследствие гиперфосфорилирования. Также важно учесть и то, что МАРТ является внутренне неупорядоченным белком, что означает, что он не имеет жесткой трехмерной структуры и может принимать множество различных конформаций, что влияет также и на образование агрегатов — структура агрегата и количество молекул МАРТ в нем имеет множество вариантов. Для решения этой проблемы было решено подобрать из списка полученных молекул-кандидатов такие, которые могут связаться как с местом агрегации МАРТ, так и с его разветвленными концами, чтобы обеспечить деградацию целевого белка. В результате было получено два перспективных соединения, обладающих аффинностью как к тау-агрегату, так и к его разветвленным концам, — амид гетероциклической акриловой кислоты и индол-амина и сульфонамид гетероциклической акриловой кислоты.

Далее в рамках проекта будет проведена *in vitro* оценка цитотоксичности и специфичности соединений на линейных культурах нейробластомы и первичных культурах нейронов посредством тестов на жизнеспособность и Western Blot. Поскольку полученные соединения являются активными молекулами, их способность проникать через ГЭБ и направленно действовать на патологический очаг будет проанализирована на мышинных моделях *in vivo*. Также будут подобраны оптимальные концентрации исследуемых соединений, не обладающих токсичностью, но имеющих выраженный терапевтический эффект.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-288

**ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИЙ КИШЕЧНИКА, СПЕРМАТЕКИ И ЯИЧНИКА
У МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ *ANOPHELES BEKLEMISHEVI*, *AN. MESSEAE* И *AN. DACIAE*
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПИТАНИЯ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ**

**STUDY OF THE BACTERIAL DIVERSITY OF INTESTINAL, SPERMATHECA AND OVARIAN
IN MALARIAL MOSQUITOES *ANOPHELES BEKLEMISHEVI*, *AN. MESSEAE* AND *AN. DACIAE*
AT DIFFERENT FEEDING STAGES OF NATURAL POPULATIONS OF WESTERN SIBERIA**

М. В. Апанасевич, К. М. Кириленко, А. А. Коханенко, Г. Н. Артемов, В. А. Бурлак, М. К. Хайдара, С. С. Алексеева

Томский государственный университет

M. V. Apanasevich, K. M. Kirilenko, A. A. Kokhanenko, G. N. Artemov, V. A. Burlak, M. K. Haidara, S. S. Alekseeva

Tomsk State University

✉ apanasevich_mv@mail.ru

Аннотация

Малярийные комары являются переносчиками ряда опасных трансмиссивных вирусных, бактериальных, гельминтных и протозойных заболеваний. В связи с этим одним из приоритетных направлений в борьбе с природно-очаговыми инфекциями является исследование бактериального разнообразия. В работе были представлены результаты секвенирования гена 16S рРНК от 17 пулов, которые были сформированы на основании вида, органа и стадии питания малярийного комара.

Abstract

Malarial mosquitoes are carriers of a number of dangerous transmissible viral, bacterial, helminthic and protozoal diseases. In connection with this, one of the priority directions in the fight against natural focal infections is the study of bacterial diversity. The paper presents the results of 16S rRNA gene sequencing from 17 pools, which were formed based on the species, organ, and feeding stage of the malarial mosquitoes.

Малярийные комары *An. beklemishevi*, *An. messeae* и *An. daciae* — это облигатные кровососущие эктопаразиты, являющиеся одними из основных компонентов очагов трансмиссивных инфекций — малярии и дирофиляриоза [1]. Комары рода *Anopheles* служат единственными переносчиками возбудителей малярии человека и других млекопитающих [2].

Посредством метагеномного 16S профилирование было описано бактериальное разнообразие внутренних органов (кишечника, сперматеки, яичника) малярийных комаров на разных стадиях питания (не питавшиеся, напитанные кровью и комары после переваривания крови). Секвенирование производилось на приборе MinION (Oxford Nanopore). Бионформатическую обработку проводили при помощи программ gurry, qcat, MinIONQC, EPI2ME. Оценка видового разнообразия и статистическая обработка данных проводилась с использованием программ R (пакеты Phyloseq, Microbiome) и Past.

Всего было обнаружено 182 вида бактерий. По результатам анали-

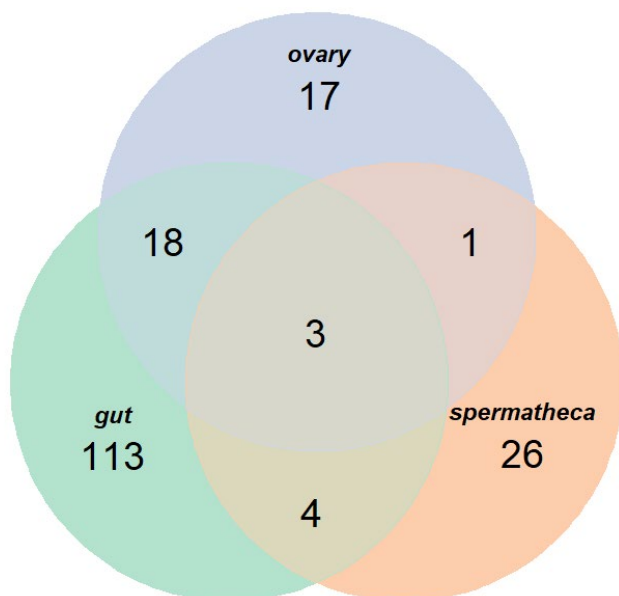


Диаграмма Венна, отображающая количественное распределение видов бактерий по органам малярийных комаров

за показано, что для кишечников характерно наибольшее бактериальное разнообразие среди трех проанализированных органов (см. рисунок). На стадии переваривания крови существенно изменяется состав микробиома и становится схожим у всех трех видов комаров. В микробиоме кишечника обнаружены симбионтные бактерии *Pantoea agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides*. По литературным данным известно, что бактерия *P. agglomerans* является симбионтом комара *Aedes albopictus* [3], а бактерия *L. mesenteroides* — комара *An. stephensi*.

В составе микробиома сперматек и яичников найдены бактерии, способные вызывать зоонозные заболевания — сальмонеллез и дизентерию. Также в микробиоме сперматек были обнаружены симбионтные бактерии комаров *Culex quinquefasciatus* (*Staphylococcus caprae*, *S. epidermidis*, *S. hominis*) [5] и *An. stephensi* (*Acinetobacter johnsonii*, *S. hominis*).

По результатам проведенного исследования было показано, что бактериальное разнообразие трех внутренних органов малярийных комаров качественно и количественно отличается по своему составу. В дополнение поступления крови в кишечник существенно влияет на микробиом трех проанализированных видов комаров.

Литература

1. Борзыкина О. В., Малышева Н. С. Кровососущие комары как источник заболеваний, передающихся трансмиссивным путем // Окружающая среда: комфортность и экологическая безопасность: сб. материалов IV Всерос. науч.-практ. конф. (Курск, 1–2 апреля 2021 г.). Курск, 2021. С. 118–122.
2. Малярийные комары и борьба с ними на территории Российской Федерации: методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000. 56 с.
3. Ranasinghe K. et al. Diversity of midgut bacteria in larvae and females of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* from Gampaha District, Sri Lanka // Parasit vectors. 2021. Vol. 14. P. 433.
4. Briones A. M. et al. *T. anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *An. gambiae* mosquitoes // ISME J. 2008. Vol. 2. P. 74–82.
5. Chandel K. et al. Midgut microbial community of *C. quinquefasciatus* mosquito populations from India // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. 10.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-289

**ВЛИЯНИЕ L-ФУКОЗЫ НА НАРУШЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ
И МЕТАБОЛИЗМА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ *MUC2*^{-/-}*****L-FUCOSE EFFECT ON DISRUPTIONS IN MITOCHONDRIAL FUNCTION AND METABOLISM
OF PERITONEAL MACROPHAGES OF *MUC2*^{-/-} MICE**

Е. Л. Аржанова

*Новосибирский государственный университет
Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск*

E. L. Arzhanova

*Novosibirsk State University
Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk*

✉ e.arzhanova@g.nsu.ru

Аннотация

L-фукоза — моносахарид, присутствующий в различных гликолипидах и гликопротеинах, и может участвовать в сигнальных процессах как эпителиальных, так и иммунных клеток, в частности макрофагов. Нами были изучены метаболические и функциональные различия перитонеальных макрофагов, полученных от модели воспалительных заболеваний кишечника и мышей контрольной группы до и после воздействия L-фукозой *in vitro*.

Abstract

L-fucose is a monosaccharide present in various glycolipids and glycoproteins and may participate in signaling processes of both epithelial and immune cells, in particular macrophages. We studied the metabolic and functional differences of peritoneal macrophages derived from a model of IBD and control mice before and after L-fucose treatment *in vitro*.

Макрофаги являются клетками врожденного иммунитета, которые играют огромную роль в развитии и хронизации различных патологий, в том числе и воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Мыши *Muc2*^{-/-} используются как модельные объекты для изучения ВЗК. Ввиду отсутствия муцина-2, составляющего слизистый барьер кишки, у животных увеличивается проницаемость кишечного эпителия, а также появляется возможность прямого контакта микробиоты с эпителиальными и иммунными клетками. В результате макрофаги поляризуются по провоспалительному M1 типу, для которых характерны нарушение функций митохондрий [1] и преобладание гликолиза в качестве основного источника энергии [2]. Фукоза, хоть и является одним из редких сахаров, представлена как в составе поверхностных гликанов бактерий, так и используется клетками млекопитающих в качестве посттрансляционных модификаций [3]. Отсутствие муцина-2 также может приводить к недостатку фукозы [4]. Макрофаги имеют специфический рецептор для распознавания фукозы (CD209), было показано, что фукоза влияет на изменения метаболического профиля перитонеальных макрофагов, смещая их в сторону поляризации по противовоспалительному M2 типу [5].

В работе использовали перитонеальные макрофаги, полученные от мышей линии *Muc2*^{-/-} и C57BL/6. Нами были проведены эксперименты по измерению количества внутриклеточных АТФ и Ca²⁺, оценке цитокинового профиля методом мультиплексного анализа, оценке клеточного дыхания методом Agilent Seahorse, и оценке уровня экспрессии генов *Parp1*, *Mt-Nd2* и *Mt-Nd6* до и после инкубации с 0.1% L-фукозой.

В нашей работе было показано снижение количества АТФ ($p < 0.05$) и внутриклеточного Ca²⁺ ($p < 0.05$), в то время как количество провоспалительных цитокинов ($p < 0.05$), количество потребляемого кислорода и уровень экспрессии генов *Parp1* ($p < 0.05$), *Mt-Nd2* и *Mt-Nd6*, ($p < 0.01$) были повышены в перитонеальных макрофагах мышей *Muc2*^{-/-} по сравнению с перитонеальными макрофагами мышей дикого типа. Фукоза показала эффект на снижение количества внутриклеточного Ca²⁺, а также на снижение уровня экспрессии генов *Parp1*, *Mt-Nd2* и *Mt-Nd6* ($p < 0.05$), что может быть свидетельством деактивации провоспалительного метаболического пути β -катенина. Также нами было зафиксировано большее количество макрофагов в собственной пластинке слизистой кишки, среди них процент макрофагов с нарушениями митохондрий был выше по сравнению с контрольной

* Работа выполнена под руководством канд. биол. наук. Е. А. Литвиновой в секторе психонейроиммунологии НИИНМ при поддержке гранта РФФ 20-64-47020.

группой. Помимо этого, процент перитонеальных макрофагов, содержащих митохондрии с высоким мембранным потенциалом, ниже у мышей *Muc2^{-/-}* по сравнению с перитонеальными макрофагами мышей дикого типа.

Литература

1. Sui G.Y. et al. Mitochondrial Control in Inflammatory Gastrointestinal Diseases // Intern. J. of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, №. 23. P. 14890.
2. Viola A. et al. The metabolic signature of macrophage responses // Frontiers in Immunology. 2019. Vol. 10. C. 1462.
3. Moloney D. J., Lin A. I., Haltiwanger R. S. The O-linked fucose glycosylation pathway: Evidence for protein-specific elongation of O-linked fucose in Chinese hamster ovary cells // J. of Biological Chemistry. 1997. Vol. 272, №. 30. P. 19046–19050.
4. Bets V.D. et al. Role of mucin 2 glycoprotein and L-fucose in interaction of immunity and microbiome within the experimental model of inflammatory bowel disease // Biochemistry (Moscow). 2022. Vol. 87, №. 4. — P. 301–318.
5. Litvinova E.A. et al. Dietary fucose affects macrophage polarization and reproductive performance in mice // Nutrients. 2021. Vol. 13, №. 3. — P. 855.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-290

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ГЕНОВАРИАНТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ*

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MAIN BOVINE LEUKEMIA VIRUS GENOVARIANTS BASED ON WHOLE GENOME SEQUENCES

Д. А. Бабошко^{1,3}, М. В. Сивай¹, А. И. Кузьмин², О. А. Рожков², А. В. Тотменин¹, М. В. Флеер², Н. М. Гашникова¹

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

²Управление ветеринарии Коченевского района, р. п. Коченёво

³Новосибирский государственный университет

D. A. Baboshko^{1,3}, A. I. Kuzmin², O. A. Rozhkov², A. V. Totmenin¹, M. V. Fleer², N. M. Gashnikova¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

²Department of Veterinary Kochenevsky District, Kochenevo

³Novosibirsk State University

✉ baboshko_da@vector.nsc.ru

Аннотация

Представлены данные о сравнительном анализе последовательностей гена env, полногеномных последовательностей и разнообразии вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в Новосибирской области. Исследовано 497 образцов крови коров из частных и крупных животноводческих хозяйств. По результатам ПЦР-анализа ДНК ВЛКРС была выявлена в 344 исследованных образцах. Для каждого из них получены и расшифрованы вирусспецифичные участки генома env. Дополнительно получены полногеномные последовательности 13 образцов генотипа 7 и 44 образца генотипа 4, проведен первичный анализ мутаций для каждого из генотипов.

Abstract

Data on the comparative analysis of the env gene sequences, genome-wide sequences and diversity of BLV in the Novosibirsk region are presented. 497 blood samples from cows from private and large livestock farms were studied. According to the results of PCR DNA analysis, BLV was detected in 344 samples studied. For each of them, virus-specific regions of the env genome were obtained and decoded. Genome-wide sequences of 13 samples of genotype 7 and 44 samples of genotype 4 were obtained, and primary mutation analysis was performed for each of the genotypes.

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота вызывает энзоотический лейкоз крупного рогатого скота. Высокая распространенность ВЛКРС приводит к потере ценных племенных пород скота, снижению молочной продуктивности и продолжительности жизни животных. Не исключается возможность роли ВЛКРС в качестве онкогенного агента при возникновении рака молочной железы у женщин [1].

Цель исследования

Определить особенности распространения генотипов вируса в разных районах Новосибирской области (НСО) и выполнить сравнительный анализ впервые полученных полногеномных последовательностей российских вариантов ВЛКРС.

Материалы и методы

Исследовано 497 образцов крови коров из Коченёвского, Тогучинского, Болотнинского и Татарского районов НСО. С помощью лабораторного набора праймеров для отдельных образцов получены, расшифрованы и исследованы полные геномы ВЛКРС протяженностью 8 714 п.н.

Результаты

Сбор образцов осуществлялся как в частных подворьях, так и крупных животноводческих хозяйствах Коченёвского района НСО. В частных подворьях собрано 147 образцов, положительными по ПЦР были 48 проб (32,6 %). Также на территории Коченёвского района собрано 200 образцов крови в животноводческом хозяйстве,

* Работа выполнена в рамках ГЗ 4-21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© Д. А. Бабошко, М. В. Сивай, А. И. Кузьмин, О. А. Рожков, А. В. Тотменин, М. В. Флеер, Н. М. Гашникова, 2023

положительными на ВЛКРС были 143 пробы (72 %). Дополнительно сбор образцов проведен в крупных хозяйствах Татарского, Тогучинского и Болотнинского районов НСО (по 60 образцов в каждом). Из них для 153 образцов получены фрагменты ВЛКРС. Филогенетический анализ, выполненный для выделенных ВЛКРС, позволил отнести 250 исследованных ВЛКРС к генотипу 4, 79 вариантов вируса — к генотипу 7.

В международной базе данных GeneBank отсутствуют последовательности российских вариантов ВЛКРС генотипа 4, не представлены полногеномные последовательности генотипа 7. Впервые проведен сравнительный анализ нуклеотидного и аминокислотного составов. Анализ мутаций генотипов 4 и 7 ВЛКРС, полученных в нашей лаборатории, позволил выделить ряд серьезных отличий от вирусов, циркулирующих на территории Бельгии и США. В районе p12-NC/Zn-finger гена Gag присутствует достаточно важная мутация в районе S358P нуклеотида, что возможно играет важную роль в упаковке вирусного капсида [2]. Также в геномах 4 и 7 ВЛКРС присутствуют достаточно много различий в аминокислотном составе конформационных эпитопов гена env, например F1458S, P1475A, H1523R, T1546I. Достаточно много мутаций обнаружилось в генах Tax/Rex, в районе Zn finger R2079C, G2093E, в районе Leucine-rich activation domain L2384P; в структурных регионах A2306T, I2182T, W2159L.

Изменения в геноме ВЛКРС могут влиять как на контагиозность разных генотипов ВЛКРС, так и патогенность, на вероятность возникновения онкологических заболеваний не только у крупного рогатого скота, но и человека [3]. Возможно, отличия в биологических свойствах ВЛКРС могут отчасти объяснить неравномерное распространение генотипов ВЛКРС в разных регионах Новосибирской области, представленных в данном исследовании.

Выводы

В НСО циркулируют генотипы 4 и 7 ВЛКРС, первый из них значительно преобладает. Прослеживаются отдельные кластеры ВЛКРС между различными районами НСО, данный факт может быть связан с закупкой племенного скота из других регионов, а также искусственным осеменением. Особенность циркуляции генотипов может быть связана не только с продолжающимся распространением по территории Новосибирской области завезенных когда-то отдельных вариантов субгенотипов ВЛКРС генотипа 4 и 7 вируса, но и с биологическими характеристиками (вирулентность, патогенность, контагиозность и др.), которые обусловлены мутациями в ключевых генах.

Литература

1. Khatami A. et al. Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis of case-control studies // *Infectious Agents and Cancer*. BioMed Central, 2020. Vol. 15, № 1.
2. Moratorio G. et al. A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas // *Vet. Res.* BioMed Central. 2013. Vol. 44, № 1. P. 1-11.
3. Aida Y. et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus // *Front. Microbiol.* 2013. Nov. 8. Vol. 4. P. 328.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-291

ГЕНОМНЫЙ ПОРТРЕТ ПОПУЛЯЦИЙ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ОЧАГОВ ЧУМЫ ПРИКАСПИЙСКОГО РЕГИОНА И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ОЧАГОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ**GENOMIC PORTRAIT OF *YERSINIA PESTIS* POPULATIONS FROM PLAGUE FOCI IN THE CASPIAN REGION AND ADJACENT FOCI OF CENTRAL ASIA**

А. Н. Балыкова, А. В. Коврижников, Г. А. Ерошенко

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

A. N. Balykova, A. V. Kovrizhnikov, G. A. Eroshenko

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of Rospotrebnadzor, Saratov

✉ alinabalnik@gmail.com

Аннотация

Исследованы штаммы *Yersinia pestis* из 17 очагов чумы, расположенных на территории четырех государств: России, Казахстана, Туркменистана и Узбекистана. Выявлен 61 SNP, который будет использован для создания SNP-панелей для дифференциации штаммов средневекового биовара. Установлены вариабельные локусы VNTR, по которым осуществляется дифференциация генетических популяций *Y. pestis*. Разработаны компьютерные программы, позволяющие автоматизировать часть этапов молекулярно-генетического типирования штаммов возбудителя чумы.

Abstract

Yersinia pestis strains from 17 natural plague foci located on the territory of four states: Russia, Kazakhstan, Turkmenistan and Uzbekistan were studied. 61 SNPs were identified, which will be used to create SNP panels for differentiating strains of the medieval biovar. Variable VNTR loci have been identified, which can be used to differentiate genetic populations of *Y. pestis*. Computer programs have been developed that allow automating some of the stages of molecular genetic typing of plague pathogen strains.

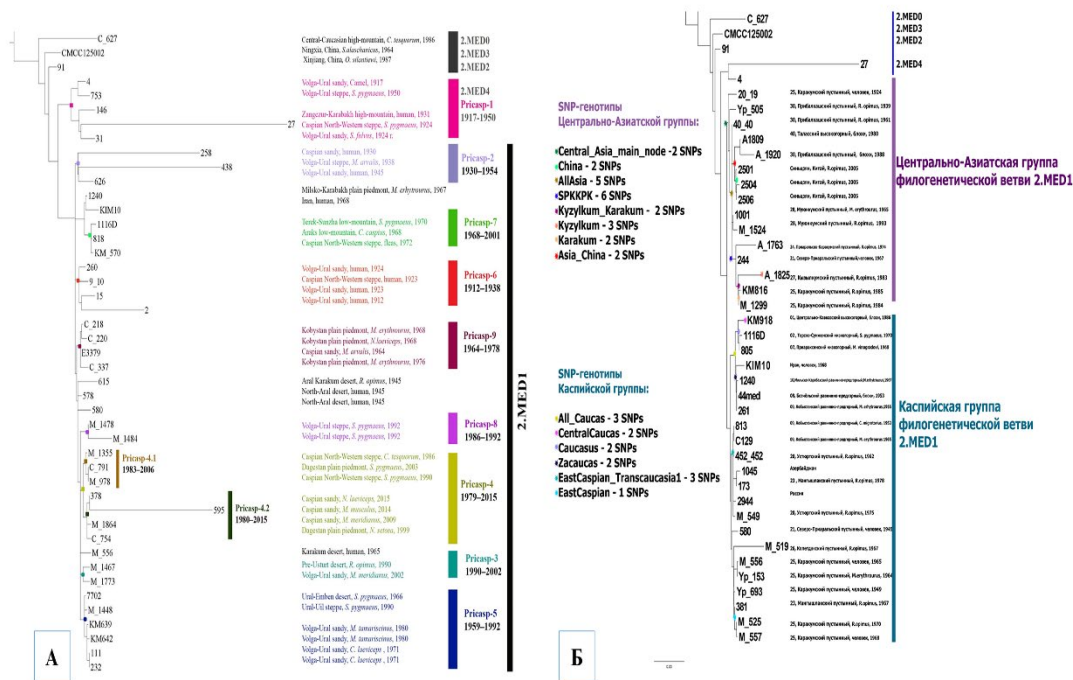
Важность изучения геномного портрета и молекулярных основ эволюции возбудителя зоонозной природно-очаговой, особо опасной инфекционной болезни — чумы, оставившей беспрецедентный след в истории и по-прежнему сохраняющей свой пандемический потенциал, не вызывает сомнений. В рамках этой работы исследованы штаммы *Yersinia pestis* из очагов чумы Прикаспийского региона и сопредельных очагов Центральной Азии, которые расположены на территории четырех государств: России, Казахстана, Туркменистана и Узбекистана. Благодаря проводимому с начала XX в. эпидемиологическому надзору в этих очагах собрана уникальная коллекция штаммов *Y. pestis*, которая хронологически отражает историю очагов чумы этого региона. Разносторонний анализ этой коллекции комбинацией методов *in vitro* и *in silico*: плазмидного скрининга, полногеномного и фрагментного секвенирования, SNP/VNTR-типирования, позволит определить внутривидовое разнообразие, популяционную структуру и генетический профиль возбудителя чумы с этих территорий.

Материалы и методы

Изучено 246 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1912–2015 гг. от носителей, переносчиков и человека на территории 17 природных очагов чумы Прикаспия, Кавказа и Центральной Азии. WG-SNP анализ и филогенетическую реконструкцию проводили в программах snippy 4.6. и SeaView 5.0.4. Секвенирование по Сэнгеру выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США). Анализ полученных последовательностей проводили при помощи программы 3500 Series Data Collection Software, оценку гомологии проводили в Mega X, exonerate и при помощи алгоритма BLAST. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Ion GeneStudio S5 System. Для обработки данных использовали Ion Torrent Suite software package 5.12, Unicycler v0.4.9. Плазмидный скрининг проводили по методике С. Kado и S.T. Lui. Определение и анализ SNP/VNTR-локусов, 76 генов (жизнеобеспечения и детерминант вирулентности) осуществляли с помощью авторских программ на языке программирования Python v3.10 и биоинформатических программ (Bionumerics 7.6.3., Tandem RepeatsFinder 4.09, MEGA X, FigTree 1.4.3.). Для оценки дискриминирующей способности метода типирования использовали индекс Хантера — Гастона (D).

Результаты исследования

По результатам молекулярно-генетического и филогенетического анализа установлена популяционная структура и определен генетический портрет основных филопопуляций *Y. pestis* из 17 очагов чумы Прикаспийского региона и сопредельных очагов Центральной Азии за период 1912–2015 гг. (см. рисунок). Проверка основных детерминант вирулентности совместно с определением плазмидного профиля подтвердила эпидемическую значимость изученных штаммов. Для автоматизации процесса SNP-/VNTR-типирования и поиска генов по данным высокопроизводительного секвенирования штаммов *Y. pestis* из очагов Прикаспийского региона и Центральной Азии разработаны удобные и эффективные биоинформатические инструменты: VNTRfinder, SNPgenotyper, SimGA. Программы реализованы на языке программирования Python v3.10 с использованием библиотек Biopython, Pandas, Fuzzywuzzy, Openpplx. Их использование может значительно оптимизировать этап геномного типирования и, как следствие, повысить эффективность молекулярно-эпидемиологического мониторинга особо опасных инфекций.



Популяционная структура *Y. pestis* средневекового биоара из очагов чумы Прикаспийского региона (А) и Центральной Азии (Б)

По данным анализа аллельного полиморфизма установлены VNTR-локусы, обладающие высокой разрешающей способностью для дифференцирования этих популяций. Наибольшей вариабельностью обладали локусы ms05, ms06, ms07, ms15, ms46, ms56, ms62, ms70, ms74 (количество аллелей локуса > 3, индекс аллельного полиморфизма $h > 0.5$). Для определения стабильных SNP-маркеров проведен WG-SNP-анализ корового генома 740 штаммов основного и неосновных подвидов *Y. pestis*, по результату которого выявлен 61 SNP. Дискриминирующий индекс Хантера–Гастона для этой схемы типирования составил $D = 0.9$, что позволяет использовать их для разработки алгоритма capSNP-типирования штаммов средневекового биоара. Также разработан способ идентификации выявленных SNPs методом фрагментного секвенирования.

Выводы

Получены новые данные по микроэволюции и генетической изменчивости популяций *Y. pestis* средневекового биоара в Прикаспийских очагах чумы, которые важны для выяснения закономерностей пространственно-временного распространения этих высоковирулентных штаммов в Восточной Европе и Центральной Азии в XX–XXI вв.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-292

**ФОСФОРАМИДНЫЕ АЗОЛЬНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ –
НОВЫЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ*****NEW PHOSPHORAMIDE AZOLE OLIGONUCLEOTIDES (FAO) FOR PCR DIAGNOSTICS**

Е. Е. Барановская, А. С. Чубаров, А. А. Ломзов, С. В. Васильева

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. E. Baranovskaya, A. S. Chubarov, A. A. Lomzov, S. V. Vasilyeva

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk✉ evgenevnalizaveta@gmail.com**Аннотация**

Впервые исследована возможность матричного ферментативного удлинения новых модифицированных фосфорамидных азольных олигонуклеотидов (ФАО) с помощью Taq ДНК-полимеразы. Выявлены закономерности позиционирования модификации в составе праймера и матрицы на эффективность удлинения праймера. На примере аллель-специфической ПЦР при выявлении точечных мутаций в гене KRAS показано повышение специфичности с сохранением высокой эффективности ПЦР.

Abstract

The possibility of matrix-assisted enzymatic elongation of new modified phosphoramidazole oligonucleotides (FAO) by Taq DNA polymerase was investigated first time. The patterns of modification positioning in the primer and matrix composition on the primer elongation efficiency were revealed. On the example of allele-specific PCR in the detection of point mutations in the KRAS gene, an increase in specificity while maintaining high PCR efficiency was shown.

На сегодняшний день, эффективное лечение заболеваний невозможно представить без проведения достоверной диагностики. Медицина успешно использует достижения естественных наук и интенсивно применяет новые методы и технологии для диагностики и лечения заболеваний. Одним из широко используемых методов молекулярной диагностики является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Успех диагностических анализов на его основе в значительной степени вызван скоростью и достоверностью получения результата. Однако в некоторых случаях выявление НК-мишени может быть затруднено, например, в случае выявления однонуклеотидных полиморфизмов, из-за низкой специфичности и селективности анализа.

Хотя на эффективность ПЦР влияет множество факторов, структура праймеров определяет ее в значительной степени, что заставляет выбирать их нуклеотидную последовательность в ходе рационального дизайна в строгом соответствии с набором установленных критериев. Наиболее часто в качестве праймеров-загрузок используют нативные олигодезоксирибонуклеотиды. Помимо них показана возможность эффективного использования ряда олигонуклеотидных производных, в состав которых введены модифицированные фрагменты с целью повышения специфичности выявления мутаций методом ПЦР. Модификации могут быть введены как в азотистые основания, так и в сахаро-фосфатный остов. В последнее десятилетие особое развитие получили модификации олигонуклеотидов по межнуклеотидному фосфатному остатку с целью улучшения свойств олигонуклеотидов. Одним из таких примеров являются разработанные в ИХБФМ СО РАН фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды, для которых показана высокая эффективность использования в качестве праймеров [1].

В настоящей работе предложены новые фосфорамидные азольные производные олигонуклеотидов (ФАО), модифицированные по фосфатному остатку гетероциклическими группами: *N*-бензимидазольными или *N*-бензоксо/(тио)азольными [2]. Нами отработана синтетическая схема введения таких остатков на стадии окисления фосфиттриэфира соответствующим азидом в ходе автоматического твердофазного фосфитамидного метода синтеза. Разработанный подход позволяет с высоким выходом получать последовательности ДНК гетеронуклеотидного состава с заданным положением модификаций. Методом УФ спектроскопии определен вклад модифицирующей группы в коэффициент экстинкции модифицированного олигонуклеотида. Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала исследована термостабильность ДНК/ДНК и ДНК/РНК дуплексов производных олигонуклеотидов.

* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-14-00358.
© Е. Е. Барановская, А. С. Чубаров, А. А. Ломзов, С. В. Васильева, 2023

Впервые исследована возможность и эффективность ферментативного матричного удлинения модифицированных ФАО. На модельных системах изучено влияние положения и вида модификации в праймере и матрице на удлинение праймера Taq ДНК-полимеразой. Установлены положения в составе праймерной и матричной цепи, в которых введение модификаций снижает эффективность удлинения праймеров.

ФАО были испытаны в качестве праймеров для выявления однонуклеотидных замен методом аллель-специфической ПЦР на примере мутации в гене KRAS с использованием модельной мутантной плазмидной ДНК на фоне ДНК дикого типа. Определены закономерности влияния числа модификаций и их положения в составе праймера на эффективность и специфичность протекания ПЦР. Полученные результаты указывают на перспективность использования новых аналогов нуклеиновых кислот для решения научных и практических задач с использованием метода ПЦР.

Литература

1. Chubarov A. S., Oscorbin I. P., Novikova L. M. et. al. Allele-Specific PCR for PIK3CA Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified Primers // *Diagnostics*. 2023. Vol. 13, № 2. P. 250.
2. Vasilyeva S. V., Baranovskaya E. E., Dyudeeva E. S. et. al. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Inter-nucleotide N-(Benzoazole)-phosphoramidate Moieties // *ACS Omega*. 2023. Vol. 8, № 1. P. 1556–1566.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-293

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА
С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ*

INVESTIGATING COMPLEXES OF HUMAN SERUM ALBUMIN
WITH LIPOPHILIC OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

И. А. Бауэр^{1,2}, Т. Д. Жарков², С. А. Жуков², М. С. Купрюшкин², А. С. Павлова², Е. В. Дмитриенко^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

I. A. Bauer^{1,2}, T. D. Zharkov², S. A. Zhukov², M. S. Kupryushkin², A. S. Pavlova², E. V. Dmitrienko^{1,2}

¹Novosibirsk State University

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ i.bauer@g.nsu.ru

Аннотация

В работе представлено исследование особенностей самосборки в наноразмерные частицы, нековалентных взаимодействий с сывороточным альбумином человека, а также проникновения в клетки A549 новых липофильных производных олигонуклеотидов. Полученные результаты указывают на большой потенциал рассмотрения этих производных в качестве основных для разработки терапевтических агентов на их основе для биомедицинских применений.

Abstract

This work presents a study of the self-assembly into nanoscale particles, non-covalent interactions with human serum albumin and cell penetration of new lipophilic oligonucleotide derivatives. The results indicate that these derivatives have great potential for the development of therapeutic agents based on them for biomedical applications.

Одним из вызовов современной биомедицинской химии является разработка высокоизбирательных терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов. К преимуществам таких агентов относится высокая селективность связывания с молекулами-мишенями за счет комплементарности азотистых оснований взаимодействующих цепей. Однако клиническое применение терапевтических олигонуклеотидов ограничивается наличием ряда проблем: дегградация нуклеазами, отрицательный заряд, быстрое выведение из организма. На сегодняшний день одним из решений является синтез химически модифицированные аналоги, способных регулировать фармакокинетические свойства целевых нуклеиновых кислот. Связывание с сывороточными белками может существенно влиять на их свойства и биологическую активность. Понимание механизмов связывания с сывороточным альбумином человека, самым распространенным белком сыворотки крови, может обеспечить новые возможности и свойства для терапевтических препаратов, такие как повышенная стабильность, снижение иммунного ответа и контролируемое биораспределение.

В ходе работы исследованы физико-химические свойства новых олигонуклеотидных производных, содержащих на 3'-конце триазиниламидофосфатную модификацию с двумя додецильными остатками, а также их комплексов с HSA. На первом этапе была исследована термостабильность дуплекса, одна из цепей которого содержит модификацию. Температура плавления в условиях, приближенных к физиологическим, показала незначительные изменения термостабильности комплементарного комплекса, что говорит о минимальном влиянии гидрофобной модификации на сродство олигонуклеотида к комплементарной последовательности. Исследуемые производные имеют тенденцию к образованию надмолекулярных структур с критической концентрацией мицеллообразования порядка 10^{-6} М. Размер надмолекулярных структур, охарактеризованный методом динамического светорассеяния, составил порядка 10 нм. При этом добавление сывороточного альбумина приводит к сдвигу пика в сторону уменьшения гидродинамического диаметра, вероятно, вследствие разрушения мицеллоподобной структуры. Методами задержки в геле, а также флуоресцентного титрования показано, что исследуемые олигонуклеотиды образуют стабильные комплексы с сывороточным альбумином человека с константой диссоциации порядка 10^{-6} М независимо от длины и состава последовательности. Для изучения цитотоксичности триазиниламидофосфатных

* Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

© И. А. Бауэр, Т. Д. Жарков, С. А. Жуков, М. С. Купрюшкин, А. С. Павлова, Е. В. Дмитриенко, 2023

производных был проведен *MTT*-тест на линии клеток A549 и были оценены IC50. Полученные значения в несколько раз превышают концентрации, обычно используемые в клеточных экспериментах. Исследуемые олигонуклеотидные производные эффективно проникают в клетки линии A549, при этом эффективность трансфекции сравнима или даже превышает случай с использованием липофектамина. Присутствие сывороточного альбумина в среде не влияет на эффективность трансфекции, а добавление эмбриональной бычьей сыворотки приводит к ее снижению, что может быть связано с деградацией олигонуклеотида нуклеазами.

Выводы

В настоящей работе представлено исследование особенностей, нековалентного связывания с сывороточным альбумином человека, а также проникновения в клетки новых липофильных производных олигонуклеотидов. Полученные данные свидетельствуют о большом потенциале использования этих производных для разработки терапевтических препаратов на их основе.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-294

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК*

DESIGN AND SYNTHESIS OF MODIFIED RNAS

И. А. Бахно

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

I. A. Bakhno

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ uta-15@mail.ru

Аннотация

РНК — это универсальный инструмент, она участвует во многих клеточных процессах. Понимание механизмов данных процессов необходимо не только для осмысливания фундаментальных основ устройства живой клетки, но и для создания лекарственных препаратов. В связи с этим требуются инструменты для создания модифицированных аналогов РНК для изучения данных процессов.

Abstract

RNA is a universal tool, it is involved in many cellular processes. Understanding the mechanisms of these processes is necessary not only to understand the fundamental principles of the structure of a living cell, but also to create drugs. In this regard, tools are required to create modified RNA analogs to study these processes.

В качестве инструментов для понимания клеточных процессов с участием РНК могут быть использованы синтетические РНК, несущие в своем составе модификации, расширяющие функционал исходной молекулы, например, как увеличение стабильности к действию нуклеаз, или метки для детекции, или модификации для конденсации с другими молекулами-участниками конкретного клеточного процесса. Один из способов введения модификаций в состав РНК реализуется с помощью *in vitro* транскрипции с использованием модифицированных рибонуклеотид трифосфатов, однако такой способ обеспечивает случайное встраивание модификации, и в случае введения объемных заместителей может приводить к снижению эффективности или абортации транскрипции.

Получение коротких модифицированных РНК с развитием твердофазного фосфитамидного метода синтеза стало рутинной задачей. Наличие множества вариантов аналогов рибонуклеотидфосфитамидов, а также ненуклеотидных фосфитамидов-модификаторов позволяет синтезировать множество аналогов олигорибонуклеотидов. Как только возникает потребность в модифицированных РНК-молекулах длиной, превышающей предел длины олигорибонуклеотида, возможного синтезировать с использованием автоматического фосфитамидного метода синтеза, вероятность получить такие РНК сильно уменьшается ввиду отсутствия универсальных эффективных методов.

Данная работа направлена на разработку химико-ферментативных методов направленного введения модификаций в ходе *in vitro* T7-транскрипции на 5'-конец синтезируемой РНК с использованием 5'-модифицированных флуоресцентных РНК-праймеров, содержащих в 2' положении -ОМе, -F, -ОН группы.

Осуществлены дизайн, синтез и очистка одноцепочечной ДНК-матрицы, олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного ДНК-матрице и содержащего последовательность T7-промотора, а также коротких флуоресцентно-меченых 2'-ОМе, -F, -ОН, РНК-праймеров различной длины. Оптимизированы условия проведения *in vitro* T7-транскрипции с использованием 2'-ОМе, -F, -ОН РНК-праймеров и одноцепочечной ДНК-матрицы. Проведено сравнительное исследование эффективности *in vitro* T7-транскрипции с использованием двух типов матричных конструкций: одноцепочечная ДНК-матрица и ДНК-матрица с двуцепочечным T7-промотором. Предложен способ удаления ДНК-матрицы из дуплекса, сформированного РНК-транскриптом и ДНК-матрицей. Проведена оптимизация условий реакции удаления ДНК матрицы из дуплекса, сформированного РНК-транскриптом и ДНК-матрицей позволяющей получить полноразмерный 5'-модифицированный РНК-транскрипт.

* Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122022100237-0.
© И. А. Бахно, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-295

ВЛИЯНИЕ МЕЗИЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ siРНК *IN VITRO***THE EFFECT OF MESYL PHOSPHORAMIDATE MODIFICATION ON siRNA POTENCY *IN VITRO***И. К. Бачкова^{1,2}, С. А. Жуков^{1,2}, М. С. Купрюшкин¹, М. А. Зенкова, Е. Л. Черноловская¹, И. В. Черников¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университетI. K. Bachkova^{1,2}, S. A. Zhukov^{1,2}, M. S. Kupryushkin¹, M. A. Zenkova¹, E. L. Chernolovskaya¹, I. V. Chernikov¹¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University

✉ i.bachkova@g.nsu.ru

Аннотация

Введение химических модификаций в состав малых интерферирующих РНК (siРНК) улучшает их биологические свойства, но может блокировать протекание РНК-интерференции (РНКi). Поэтому в данной работе был проведен скрининг паттернов модификации siРНК с мезильными группами (μ), охватывающих 70 % позиций в siРНК. В большинстве положений мезильная модификация не нарушала процесс РНКi, поэтому введение μ может потенциально улучшать ее биологические свойства *in vivo*.

Abstract

The introduction of chemical modifications into the composition of small interfering RNA (siRNA) improves its biological properties, but can inhibit the RNA interference (RNAi) process. Therefore, in this work, we screened the patterns of modification of siRNAs with mesyl groups (μ), covering 70% of positions in siRNAs. In most positions, μ did not inhibit the RNAi process, so the introduction of μ can potentially improve its biological properties *in vivo*.

siРНК способны направленно подавлять экспрессию гена-мишени, поэтому являются перспективными агентами для терапии многих заболеваний человека. Однако использование siРНК в биомедицине ограничено чувствительностью siРНК к действию нуклеаз. Для увеличения нуклеазоустойчивости siРНК используются 2'-F, 2'-O-метильная модификация и фосфотиатная группа (PS). При этом PS применяют только в нескольких концевых нуклеотидах siРНК, поскольку их высокое содержание способно вызывать токсические эффекты. Поэтому актуален поиск новых модификаций фосфата siРНК, которые могут заменить PS для дальнейшего улучшения фармакологических свойств siРНК. Мезильная группа (μ) — это новая модификация фосфата, которая обеспечивает большую нуклеазоустойчивость, чем PS, и не проявляет токсических свойств [1]. Однако влияние μ на ингибирование процесса РНКi не изучено, поэтому в данной работе мы исследовали изменение биологической активности siРНК при введении в ее состав μ .

На первом этапе работы мы определяли возможность использования мезильной модификации в качестве прямой замены PS. Для этого было проведено сравнение активности siРНК с двумя PS по обоим концам цепей и siРНК с аналогичным паттерном μ модификаций. Относительную активность siРНК ($Отн_A$) рассчитывали как отношение IC_{50} для контрольной siРНК без модификаций фосфата к IC_{50} для siРНК, содержащих модификации фосфата. Показано, что концевые PS в обеих цепях siРНК незначительно ухудшают процесс РНКi ($Отн_A = 0.5$), в то время как аналогичный паттерн мезильных модификаций ингибирует РНКi, снижая $Отн_A$ до 0.008. Ингибирующее влияние концевых μ модификаций сохраняется при их использовании только в составе антисмысловой цепи ($Отн_A = 0.009$), в том числе при уменьшении количества терминальных μ групп до одной на каждом конце цепи ($Отн_A = 0.012$). Напротив, концевые μ модификации в составе смысловой цепи не изменяли относительную активность siРНК, которая составила 1.0.

Для идентификации возможных эффектов μ модификации, проявляющихся в зависимости от позиции, был проведен скрининг siРНК, содержащих одну μ модификацию в различных положениях по всей длине обеих цепей. Всего из 20 возможных положений для каждой цепи было протестировано 7 положений в смысловой цепи и 10 — в антисмысловой. Как и ожидалось, была показана хорошая переносимость μ модификации в составе смысловой цепи — относительная активность для всех siРНК находилась в промежутке от 1.0 до 1.5. При этом,

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-14-00251.

активность siРНК также не уменьшалась при использовании μ модификации в 9 из 10 протестированных положений антисмысловой цепи, составляя от 0.7 до 1.9. Только в первом положении антисмысловой цепи μ модификация снижала относительную активность siРНК до 0.08. Вероятно, μ в данном положении стерически затрудняет образование комплекса антисмысловой цепи с компонентами РНКi или препятствует фосфорилированию 5' конца цепи, которое необходимо для протекания РНКi.

Для определения возможных эффектов взаимодействия между μ модификациями была исследована активность siРНК, содержащих некоторые комбинации двух μ модификаций. Было показано, что снижение относительной активности siРНК до 0.04–0.07 вызвано только комбинациями, в которых антисмысловая цепь содержала μ в первом положении. Остальные комбинации μ незначительно влияли на относительную активность siРНК, которая составила 0.6–1.2. Поскольку большинство исследованных позиций и их комбинации не влияли на процесс РНКi, мы оценили активность siРНК, содержащей μ во всех позициях смысловой цепи, кроме трех нуклеотидов в центральной части цепи. Показано, что такая siРНК обладала сходной с контрольной siРНК активностью (Отн_А 0.8).

Таким образом, в данной работе было впервые показано, что в большинстве положений siРНК использование мезильной модификации совместимо с протеканием РНКi, и это свойство сохраняется при использовании множественных μ групп. Поэтому можно ожидать, что использование μ модификации может снизить токсичность siРНК за счет снижения количества PS в ее составе и в значительной степени увеличить длительность ее биологического действия *in vivo*.

Литература

1. Mirosnichenko S.K. et al. Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // Proc. Natl. Acad. Sci. 2019. Vol. 116, № 4. P. 1229–1234.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-296

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЛИЗОСОМНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *GBA1**

ALTERATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF LYSOSOMAL ACTIVITY UPON INHIBITION OF LRRK2 KINASE ACTIVITY IN CELL LINES FROM PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATED WITH MUTATIONS IN THE *GBA1* GENE

К. С. Башарова¹, А. И. Безрукова^{1,2}, Е. В. Григорьева³, Г. В. Байдакова⁴, С. В. Павлова³,
И. В. Милюхина⁵, С. П. Медведев³, Е. Ю. Захарова⁴, С. Н. Пчелина^{1,2}, Т. С. Усенко^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики

им. Б. П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

⁴Медико-генетический научный центр имени акад. Н. П. Бочкова, Москва

⁵Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург

K. S. Basharova¹, A. I. Bezrukova^{1,2}, E. V. Grigor'eva³, G. V. Baydakova⁴, S. V. Pavlova³,
I. V. Miliukhina⁵, S. P. Medvedev³, E. Yu. Zakharova⁴, S. N. Pchelina^{1,2}, T. S. Usenko^{1,2}

¹Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov
of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina

²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

³Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

⁴Research Centre for Medical Genetics, Moscow

⁵Institute of Human Brain RAS, Saint Petersburg

✉ kbasharova@yandex.ru

Аннотация

В настоящее время обсуждается перспектива использования ингибиторов LRRK2 для лечения болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA*-БП), кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (*GCCase*). В данном исследовании оценена эффективность ингибитора киназной активности LRRK2 *MLi-2* в восстановлении функций *GCCase*, а также влияние *MLi-2* на активность других лизосомных ферментов в клеточных линиях пациентов с *GBA*-БП, *LRRK2*-БП.

Abstract

The prospect of using LRRK2 inhibitors as treatment strategy for Parkinson's disease (PD) associated with mutations in the gene *GBA1* (*GBA*-PD), encoding the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (*GCCase*) is currently being discussed. We assessed the effectiveness of the LRRK2 kinase activity inhibitor *MLi-2* in restoring *GCCase* functions and the effect on the activity of other lysosomal enzymes in cell lines of patients with *GBA*-PD, *LRRK2*-PD.

Введение

Молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза болезни Паркинсона (БП), неизвестны, поэтому не существует препаратов, способных остановить гибель нейронов. Препараты, ингибирующие киназную активность богатой лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*), находятся на второй стадии клинических испытаний для терапии БП, ассоциированной с мутациями в гене *LRRK2* (*LRRK2*-БП). Ранее было показано, что ингибирование киназной активности *LRRK2* при гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA1*, которые являются фактором высокого риска БП, приводит к увеличению активности лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (*GCCase*), кодируемого геном *GBA1* [1].

* Исследование поддержано грантом РФФ №22-25-00501.

Цель данной работы заключалась в оценке возможности использования ингибитора киназной активности LRRK2 MLi-2 для терапии БП, ассоциированной с мутациями в гене GBA1 (GBA-БП) путем оценки влияния MLi-2 на биохимические параметры лизосомной активности в клеточных линиях пациентов с GBA-БП.

Материалы и методы

Для данного исследования получены первичная культура макрофагов периферической крови 8 пациентов с GBA-БП, 3 пациента с LRRK2-БП и 7 индивидуумов контрольной группы и культура ИПСК-ДН 1 пациента с GBA-БП, 1 пациента с LRRK2-БП и 1 контроля. Клеточные линии культивировались без и в присутствии селективного ингибитора киназной активности LRRK2 MLi-2 (Abcam, Англия). Активность лизосомных ферментов (GCase, альфа-галактозидаза (GLA), кислая сфингомиелиназа (ASMase), галактозилцереброзидазы (GALC)) оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, (ВЭЖХ-МС/МС). Колокализацию GCase (Alexa Fluor 488) с лизосомным маркером LAMP-2 (Cy3) оценивали с помощью конфокальной микроскопии (Leica TCS-SP5). Соотношение белковой изоформы LC3B-II к изоформе LC3B-I, для оценки степени аутофагии, и относительное количество белка GCase оценивали методом ветерн-блота.

Результаты

Было показано, что активность GCase и степень транслокации GCase в лизосомы снижена в первичной культуре макрофагов пациентов с GBA-БП и LRRK2-БП по сравнению с контролем ($p = 0.038$, $p = 0.048$; $p = 0.00023$, $p < 0.0001$ соответственно) и в ИПСК-ДН пациентов с GBA-БП по сравнению с контролем и LRRK2-БП ($p = 0.00019$, $p = 0.0029$; $p = 0.031$, $p = 0.0049$ соответственно) при культивировании без MLi-2. Также было показано, что при культивировании без MLi-2 активность GALC снижена как в первичной культуре макрофагов, так и в ИПСК-ДН пациентов с LRRK2-БП по сравнению с контролем ($p = 0.043$, $p = 0.015$ соответственно).

Ингибирование LRRK2 приводило к увеличению активности GCase в макрофагах пациентов с GBA-БП ($p = 0.016$) и ИПСК-ДН пациентов с GBA-БП, LRRK2-БП и контроля ($p = 0.013$; $p = 0.042$, $p = 0.016$ соответственно). Также было показано увеличение степени транслокации GCase в лизосомы в макрофагах пациентов с GBA-БП и LRRK2-БП ($p < 0.0001$) и в ИПСК-ДН пациентов GBA-БП, LRRK2-БП и контроля ($p = 0.008$, $p = 0.0031$, $p = 0.0075$ соответственно) при культивировании в присутствии MLi-2. Интересно отметить, что ингибирование LRRK2 как в макрофагах пациентов с GBA-БП, так и ИПСК-ДН пациентов GBA-БП и LRRK2-БП восстанавливало активность и степень транслокации в лизосомы GCase до уровня, наблюдаемого в контроле без MLi-2 ($p > 0.05$). Относительный уровень белка GCase при культивировании в присутствии MLi-2 как макрофагов, так и ИПСК-ДН повышался в группе пациентов с GBA-БП и LRRK2-БП, не достигая статистической значимости.

Впервые показано, что ингибирование LRRK2 приводит к увеличению активности ASMase, GALC и GLA в макрофагах пациентов с GBA-БП ($p = 0.0078$, $p = 0.0078$, $p = 0.012$ соответственно) и ASMase и GLA в ИПСК-ДН пациентов с GBA-БП и контроля ($p = 0.00098$, 0.00049 ; $p = 0.028$, $p = 0.00098$ соответственно).

Соотношение белковой изоформы LC3B-II к LC3B-I было повышено в макрофагах и ИПСК-ДН пациентов с GBA-БП и LRRK2-БП при культивировании без MLi-2 и не изменялся при культивировании в присутствии MLi-2.

Заключение

Нами подтверждена эффективность ингибитора киназной активности LRRK2 MLi-2 в восстановлении функций GCase, а также впервые показано влияние MLi-2 на активность других лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов периферической крови и ИПСК-ДН пациентов с GBA-БП, LRRK2-БП. Полученные результаты расширяют представления о функциональных взаимодействиях LRRK2 и GCase в клетке, а также перспективы разработки таргетной терапии БП.

Литература

1. Усенко Т. С., Башарова К. С., Безрукова А. И. и др. Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона // Медицинская генетика. 2022. Т. 21(12). С. 26–29.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-297

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АУТОФАГИИ У ПАЦИЕНТОВ С GBA-АССОЦИИРОВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *GBA1****EXPRESSION OF AUTOPHAGY-RELATED GENES IN *GBA1* MUTATIONS CARRIERS WITH AND WITHOUT PARKINSON'S DISEASE**А. И. Безрукова^{1,2}, К. С. Башарова¹, И. В. Милюхина¹⁻³, С. Н. Пчелина^{1,2}, Т. С. Усенко^{1,2}¹*Петербургский институт ядерной физики**им. Б. П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина*²*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова*³*Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург*A. I. Bezrukova^{1,2}, K. S. Basharova¹, I. V. Miliukhina¹⁻³, S. N. Pchelina^{1,2}, T. S. Usenko^{1,2}¹*Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov
of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina*²*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*³*Institute of Human Brain RAS, Saint Petersburg*

✉ bz.nastya96@gmail.com

Аннотация

Молекулярные механизмы нейродегенеративного заболевания — болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA*-БП), неизвестны. Последние данные указывают на роль аутофагии, в части пути *PI3K/АКТ/mTOR*, в патогенезе БП. В исследовании выявлены более выраженные изменения в уровне экспрессии генов, продукты которых вовлечены в путь *PI3K/АКТ/mTOR*, у пациентов с *GBA*-БП по сравнению с бессимптомными

Abstract

The molecular mechanisms of the neurodegenerative disease, Parkinson's disease (PD), associated with mutations in the *GBA1* gene (*GBA*-PD) are unknown. Recent data point to the role of autophagy, in particular of the *PI3K/АКТ/mTOR* pathway, in PD pathogenesis. The study revealed pronounced alterations in the expression of autophagy-related genes are involved in the *PI3K/АКТ/mTOR* pathway in *GBA*-PD.

Введение

Молекулярные механизмы болезни Паркинсона (БП), распространенного нейродегенеративного заболевания, ассоциированного с мутацией в гене *GBA1* (*GBA*-БП), кодирующий лизосомный фермент бета-глюкоцереброзидазу (*GCase*), неизвестны. Более того, не у всех носителей мутаций в гене *GBA1* развивается БП в течение всей жизни (*GBA*-носители). Однако последние данные предполагают роль дисфункции аутофагии в патогенезе БП, в частности *GBA*-БП [1]. Так, ранее нами в ходе анализа транскриптомов клеток мозга модельных животных с паркинсонизмом и дисфункцией фермента *GCase* и клеточных линий пациентов с *GBA*-БП было выявлено нарушение работы пути *PI3K/АКТ/mTOR*, который является важным звеном в регуляции процессов аутофагии [2, 3].

Цель данной работы заключалась в оценке профиля экспрессии генов аутофагии, и генов, в частности, вовлеченных в путь *PI3K/АКТ/mTOR*, выявленных на основе анализа транскриптомов первичной культуры макрофагов периферической крови пациентов с *GBA*-БП и клеток черной субстанции мозга мышшиной модели с паркинсонизмом и с дисфункцией *GCase*.

Материалы и методы

В настоящее исследование были включены пациенты с *GBA*-БП, *GBA*-носители, пациенты со спорадической формой БП (сБП), неврологически здоровые индивидуумы (контроль). Оценка уровня мРНК генов аутофагии (*mTOR*, *MAP1LC3B*, *VECN1*, *SQSTM1*, *CTSD*), генов, выявленных в ходе анализа транскриптома макрофагов периферической крови пациентов с *GBA*-БП и контроля (*ARL4C*, *DUSP1*, *BCL6*, *TRIM13*), и генов, выявленных

* Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер 121060200125-2).

в ходе анализа транскриптома клеток черной субстанции (ЧС) мышей с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП)-индуцированным паркинсонизмом с дисфункцией GCase посредством селективного ингибитора кондуритол-бета-эпокида (СВЕ) и контрольной группы мышей (SGK1, PDK4, ARL4D), проводилась в МПК всех индивидуумов, включенных в исследование, методом ПЦР в режиме реального времени. Аутофагия была оценена по уровню белка LC3B (LC3B-I и LC3B-II), который кодируется геном MAP1LC3B, а также по соотношению белковой изоформы LC3B-II к изоформе LC3B-I в МПК методом вестерн-блота.

Результаты

Показано увеличение экспрессии гена MAP1LC3B в МПК пациентов с GBA-БП и GBA-носителей по сравнению с пациентами с сБП ($p < 0.05$), а также более выраженное увеличение относительного уровня мРНК гена MAP1LC3B у пациентов с GBA-БП по сравнению с контролем ($p = 0.032$). На фоне изменения уровня мРНК гена MAP1LC3B было показано увеличение белковых изоформ LC3B-I и LC3B-II в МПК у пациентов с GBA-БП и сБП по сравнению с контролем, а также увеличение отношения LC3B-II/LC3B-I у пациентов с GBA-БП по сравнению с контролем, однако эти изменения не достигли статистической значимости. Относительный уровень мРНК гена mTOR был повышен у пациентов с GBA-БП и пациентов со сБП по сравнению с контролем и GBA-носителями ($p < 0.05$).

Было выявлено увеличение относительного уровня мРНК гена ARL4C в МПК GBA-носителей по сравнению с пациентами с сБП и контролем ($p < 0.01$). Экспрессия гена BCL6 в МПК была статистически значимо выше у пациентов с сБП, чем в контроле и у пациентов с GBA-БП ($p < 0.001$). Относительный уровень мРНК гена DUSP1 в МПК был снижен у пациентов с сБП по сравнению с GBA-носителями и контролем ($p < 0.05$). Уровень экспрессии гена DUSP1 в МПК был значительно снижен у пациентов с GBA-БП по сравнению с GBA-носителями и контролем ($p < 0.01$), что согласуется с результатами анализа транскриптома макрофагов периферической крови пациентов с GBA-БП и контроля.

Пациенты с GBA-БП и GBA-носители характеризовались повышенным уровнем экспрессии гена ARL4D в МПК по сравнению с пациентами с сБП ($p < 0.001$), которые, в свою очередь, характеризовались снижением экспрессии гена ARL4D по сравнению с контрольной группой ($p = 0.0043$). Относительный уровень мРНК генов SGK1 был снижен в МПК у пациентов с GBA-БП по сравнению с пациентами с сБП и контролем ($p < 0.01$). Эти результаты подтверждают данные, полученные в ходе анализа транскриптома клеток ЧС мышей (МФТП)-индуцированным паркинсонизмом с дисфункцией GCase и контрольных мышей.

Заключение

Показано изменение профиля экспрессии генов аутофагии при дисфункции GCase. Выявлено увеличение экспрессии маркера аутофагии гена MAP1LC3B у пациентов с GBA-БП на фоне увеличения белка LC3B по сравнению с контролем. В тоже время, пациенты с GBA-БП характеризовались выраженным изменением уровня экспрессии генов mTOR и DUSP1 как по сравнению с контролем, так и с GBA-носителями, что может являться потенциальным биомаркером БП среди носителей мутаций в гене GBA1. Полученные результаты подтверждают роль нарушения процессов аутофагии в патогенезе GBA-БП, в частности, сигнального пути PI3K/AKT/mTOR.

Литература

1. Pradas E., Martinez-Vicente M. The Consequences of GBA Deficiency in the Autophagy-Lysosome System in Parkinson's Disease Associated with GBA // Cells. 2023. Vol. 12. P. 191.
2. Usenko T., Bezrukova A., Basharova K. et al. Comparative Transcriptome Analysis in Monocyte-Derived Macrophages of Asymptomatic GBA Mutation Carriers and Patients with GBA-Associated Parkinson's Disease // Genes. 2021. Vol. 12. P. 1545.
3. Башарова К. С., Усенко Т. С., Безрукова А. И. и др. Поиск биомаркеров GBA-ассоциированной болезни Паркинсона на основе анализа транскриптома клеток черной субстанции головного мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом и дисфункцией глюкоцереброзидаз // Сб. тезисов IV форума молодых ученых Будущее биомедицины 2023 = Future of Biomedicine: Young 2023 (Владивосток, 19–21 апреля 2023 г.). Владивосток: Издательство Дальневосточного федерального университета, 2023. С. 11.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-298

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МАКРОФАГОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС
С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ*****CHANGES IN THE LEVEL OF MACROPHAGES IN THE ADIPOSE TISSUE OF RATS
WITH METABOLIC SYNDROME**Ю. Г. Бирулина¹, В. В. Иванов¹, Е. Е. Буйко¹, О. В. Воронкова¹, Н. А. Чернышов¹, Т. С. Геращенко²¹ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск² НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАНYu. G. Birulina¹, V. V. Ivanov¹, E. E. Buyko¹, O. V. Voronkova¹, N. A. Chernyshov¹, T. S. Gerashchenko²¹ Siberian State Medical University, Tomsk² Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center

✉ birulina20@yandex.ru

Аннотация

Целью исследования являлась оценка уровня CD68-позитивных макрофагов в жировой ткани у крыс в модели диет-индуцированного МС на фоне изменения концентрации провоспалительных цитокинов. У животных, находившихся на высокожировой и высокоуглеводной диете, на фоне увеличения массы тела, ожирения, метаболических нарушений, высокой концентрации цитокинов IL-10 и TNF- α и наблюдалось повышение содержания CD68-макрофагов в жировой ткани.

Abstract

The aim of the study was to assess the level of CD68-positive macrophages in adipose tissue in rats with of diet-induced MetS against the background of changes in the concentration of pro-inflammatory cytokines. In animals fed a high-fat and high-carbohydrate diet, there was an increase in body weight, obesity, metabolic disorders, a high concentration of cytokines IL-10 and IL-10, an increase in the content of CD68 macrophages in adipose tissue was observed.

Важная роль в развитии и прогрессировании хронических неинфекционных заболеваний, таких как сердечно-сосудистая патология, хроническая обструктивная болезнь легких, сахарный диабет 2 типа, ожирение и др., отводится хроническому воспалению, при этом клетки моноцитарно-макрофагальной системы выступают в качестве основных регуляторных и эффекторных элементов, опосредующих стереотипные и специфические воспалительные изменения в органах и тканях [1]. Как известно, в большей степени эффекторный потенциал рекрутируемых в ткани циркулирующих моноцитов формируется элементами микроокружения в очаге воспаления [2]. Однако функциональный фенотип моноцитов крови может быть переформирован на фоне системных нарушений обмена веществ, сопровождающих многие хронические неинфекционные заболевания в сочетании с метаболическим синдромом (МС) [3]. Целью исследования явилось определение уровня макрофагов в жировой ткани крыс с диет-индуцированным МС.

В качестве объекта исследования использовали крыс-самцов линии Wistar (23 животных), которых распределили на контрольную и опытную группы. Крысы 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%-й раствор фруктозы. Животных выводили из эксперимента методом CO₂-асфиксии, из сердца отбирали кровь, извлекали висцеральную жировую ткань. В сыворотке крови оценивали биохимические параметры, включая показатели липидного спектра, а также концентрацию цитокинов IL-6, IL-10, TNF- α методом ИФА (ABclonal Biotechnology Co., Ltd, Китай). В жировой ткани крыс обеих групп методом ОТ-ПЦР оценивали уровень экспрессии CD68-маркера макрофагов с помощью набора обратная транскриптаза M-MuLV-RH (ООО «Биолабмикс», Россия). ПЦР в режиме реального времени выполняли с помощью набора реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2 \times) (ООО «Биолабмикс», Россия). Праймеры и зонды к генам ACTB1 и CD68 были синтезированы ООО «ДНК-Синтез» (Россия).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20039, <https://rscf.ru/project/22-25-20039/> и средств Администрации Томской области.

© Ю. Г. Бирулина, В. В. Иванов, Е. Е. Буйко, О. В. Воронкова, Н. А. Чернышов, Т. С. Геращенко, 2023

Содержание животных на высокожировой и высокоуглеводной диете приводило к ожирению, повышению артериального давления, гипергликемии, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, триглицеридемии. Сывороточная концентрация IL-10 и TNF- α в крови у экспериментальных крыс оказалась выше, чем у контрольных животных в среднем в 3,7 и 4,2 раза соответственно ($p < 0,05$). Экспрессия гена CD68 в жировой ткани крыс опытной группы увеличилась в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Таким образом, при МС было зарегистрировано повышение уровня макрофагов в жировой ткани, общие признаки воспаления, характеризующиеся повышением в крови концентрации про- и противовоспалительных цитокинов. Вероятно, что высокий уровень цитокинов в крови при МС поддерживается за счет секреторной активности тканевых клеточных элементов.

Литература

1. Kapellos T. S., Bonaguro L., Gemünd I. et. al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases // *Frontiers in Immunology*. 2019. Vol. 10. P. 2035.
2. Mossel D. M., Moganti K., Riabov V. et. al. Epigenetic Regulation of S100A9 and S100A12 Expression in Monocyte-Macrophage System in Hyperglycemic Conditions // *Front Immunol*. 2020. Vol. 11. P. 1071.
3. Романцова Т. И., Сыч Ю. П. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении // *Ожирение и метаболизм*. 2019. Т. 16, № 4. С. 3–17.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-299

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ АЛЛОДИНИИ, СВЕТОБОЯЗНИ И ТРЕВОЖНОСТИ
У КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ,
ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ НИТРОГЛИЦЕРИНА ***

**STUDY OF MECHANICAL ALLODYNIA, PHOTOPHOBIA AND ANXIETY IN RATS
WITH PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA IN CHRONIC MIGRAINE CAUSED BY THE
ADMINISTRATION OF NITROGLYCERIN**

К. С. Богатова, О. В. Яковлева

Казанский федеральный университет

K. S. Bogatova, O. V. Yakovleva

Kazan Federal University

✉ kowarik.ru@yandex.ru

Аннотация

В данном исследовании мы анализировали связь гипергомоцистеинемии (ГГц) с развитием мигрени у самцов крыс линии Wistar. Моделирование мигрени осуществляли посредством повторного внутрибрюшинного введения нитроглицерина. У крыс с ГГц было выявлено снижение порога механической чувствительности в тесте «Волоски Фрея», и наблюдалось развитие тревожности и фотофобии в тесте «Темно-светлая камера».

Abstract

In this study, we analyzed the relationship of hyperhomocysteinemia (HHcy) with the development of migraine in male *Wistar* rats. Migraine modeling was carried out by repeated intraperitoneal administration of nitroglycerin. In rats with HHcy, a decrease in the threshold of mechanical sensitivity was revealed in the Von Frey test, and the development of anxiety and photophobia was also observed in the light-dark box test.

Мигрень представляет собой неврологическое заболевание, которому характерны повторяющиеся приступы головной боли и различные симптомы (например, фото- и фонофобия, тревога) [1]. Известно, что повышенный уровень гомоцистеина в плазме крови коррелирует с развитием мигрени [2]. Такие патологические состояния, как эндотелиальная дисфункция, тромбоз, окислительный стресс, возникающие при ГГц, предположительно являются возможными механизмами патогенеза мигрени [3, 4]. Нитроглицерин (НТГ) — донор оксида азота, является триггером мигрени и широко используется для моделирования хронической мигрени у животных [5].

Цель — проанализировать механическую чувствительность, светобоязнь и уровень тревожности у крыс с пренатальной ГГц в ответ на повторное введение НТГ.

Было сформировано две группы самцов крыс линии Wistar в возрасте 2–3 месяцев: 1) контрольная — крысы, рожденные от самок на стандартной диете ($n = 12$); 2) гипергомоцистеиновая (ГГц) — крысы, рожденные от самок на метиониновой диете ($n = 10$). Для моделирования хронической мигрени крысам вводили НТГ (10 мг/кг в 0.9%-й NaCl) внутрибрюшинно в течение 9 дней (на первые, третьи, пятые, седьмые и девятые сутки эксперимента). Исследование механической чувствительности проводили в тесте «Волоски Фрея» до и через 2 часа после введения НТГ. Оценка светобоязни и тревожности осуществлялась с помощью теста «Темно-светлая камера» на 1-е и 9-е сутки эксперимента до и через 2 часа после введения НТГ.

В тесте «Волоски Фрея» у животных контрольной группы порог механической чувствительности до начала моделирования мигрени составил 25.3 ± 1.4 г/мм². Достоверное снижение наблюдалось только на 5-й день введения НТГ (20.1 ± 1.4 г/мм², $p < 0.05$) и сохранялось пониженным до конца эксперимента. В группе ГГц порог чувствительности до введения НТГ был значительно ниже контроля — 21.6 ± 0.8 г/мм² ($p < 0.05$), а достоверное снижение наблюдалось уже в 1-й день введения НТГ (17.5 ± 0.7 г/мм², $p < 0.05$). Порог механической чувствительности в группе ГГц снижался в течение всего эксперимента и к 9-му дню составил 13.7 ± 1.1 г/мм² ($p < 0.05$). Кроме того, повторное введение НТГ вызывало хроническую базальную механическую гиперчувствительность: в контроле значительная базальная аллодиния наблюдалась на 5-й день экспери-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 20-15-00100-П.

© К. С. Богатова, О. В. Яковлева, 2023

мента (23.3 ± 1.1 г/мм², $p < 0.05$), тогда как в группе ГГц данный показатель снизился уже на 3-й день эксперимента (19.1 ± 1.2 г/мм², $p < 0.05$).

В тесте «Темно-светлая камера» латентное время захода в темную камеру до введения НТГ у контрольных животных составило 39.1 ± 5.3 с, тогда как в группе ГГц оно изначально было ниже — 22.3 ± 4.7 с. Введение НТГ снизило данный параметр до 12.7 ± 3.3 с ($p < 0.05$) в контрольной группе, а в группе ГГц — до 6.3 ± 1.8 с ($p < 0.05$). Время, проведенное в светлой камере, до введения НТГ было значительно больше у контрольных животных (81.9 ± 6.4 с) по сравнению с группой ГГц (69.7 ± 11.3 с, $p < 0.05$). Через 2 часа данный параметр сократился в обеих группах: до 61.4 ± 10.1 с в контроле и до 36.8 ± 8.5 с — в группе ГГц ($p < 0.05$). На 9-й день эксперимента латентное время захода в темную камеру до введения НТГ было ниже по сравнению с первым днем как в контрольной группе, так и в группе ГГц и составило 15.8 ± 6.3 с и 12.3 ± 4.0 с ($p > 0.05$) соответственно. Через 2 часа после введения НТГ этот параметр снизился до 8.8 ± 1.4 с и 6.6 ± 1.4 с ($p > 0.05$). Время, проведенное в светлой камере, на 9-й день эксперимента до введения НТГ было ниже по сравнению с 1-м днем в обеих группах и составило 62.3 ± 6.1 с в контроле и 34.2 ± 9.7 с в группе ГГц ($p < 0.05$). Через два часа после введения НТГ это время еще больше сократилось и составило 40.1 ± 3.2 с и 17.8 ± 5.7 с ($p < 0.05$) соответственно.

Таким образом, в модели хронической мигрени, вызванной введением НТГ, у крыс с пренатальной ГГц аллодиния, светобоязнь и тревожность развиваются быстрее, чем в контрольной группе.

Литература

1. Dodick D.W. Migraine // *Lancet*. 2018. Vol. 391(10127). P. 1315–1330.
2. Lippi G., Mattiuzzi C., Meschi T. et al. Homocysteine and migraine. A narrative review // *Clinica Chimica*. 2014. Vol. 433. P. 5–11.
3. Tietjen G.E., Collins S.A. Hypercoagulability and migraine // *Headache*. 2018. Vol. 58(1). P. 173–183.
4. Chen S., Dong Z., Zhao Y. et al. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction involving the crosstalk between oxidative stress and mitochondrial pSTAT3 in rat ischemic brain // *Scientific reports*. 2017. Vol. 7(1). Art. 6932. 12 p.
5. Demartini C., Greco R., Zanaboni A.M. et al. Nitroglycerin as a comparative experimental model of migraine pain: From animal to human and back // *Progress in neurobiology*. 2019. Vol. 177. P. 15–32.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-300

**РОЛЬ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА В МЕХАНИЗМЕ АКТИВНОСТИ
ПРАЙМАЗЫ-ПОЛИМЕРАЗЫ PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА*****THE ROLE OF C-TERMINAL DOMAIN IN ACTIVITY OF HUMAN PRIMASE-POLYMERASE PRIMPOL**

Е. О. Болдинова¹, А. Г. Барановский², Ю. В. Филина³,
Р. Р. Мифтахова³, А. А. Манукян¹, Т. Тагиров², А. В. Макарова¹

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

²Институт исследований рака и сопутствующих заболеваний,
Медицинский центр Университета Небраски, Омаха

³НИЛ «Трансляционная онкология», Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанского федерального университета

E. O. Boldinova¹, A. G. Baranovskiy², Yu. V. Filina³, R. R. Miftakhova³, A. A. Manukyan¹, T. Tagirov², A. V. Makarova¹

¹National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow

²Eppley Institute for Research in Cancer and Allied Diseases, Fred & Pamela Buffett Cancer Center,
University of Nebraska Medical Center, Omaha

³Research Laboratory “Translational Oncology”, Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan Federal University

✉ lizaboldinova@yandex.ru

Аннотация

Праймаза-полимераза PrimPol играет важную роль в поддержании стабильности генома, участвуя в механизме ре-инициации синтеза ДНК. В работе показано, что С-концевой домен PrimPol играет ключевую роль в регуляции активности фермента, модулируя аффинность PrimPol к ДНК и обеспечивая стабилизацию входящего инициаторного нуклеотида. Также в работе исследована активность клинически значимых вариантов PrimPol с заменами в С-концевом домене.

Abstract

Primase-polymerase PrimPol plays an important role in maintaining the stability of the genome by participating in the mechanism of DNA synthesis restart. The work shows that the C-terminal domain of PrimPol plays a key role in the regulation of enzyme activity, modulating the affinity of PrimPol for DNA and providing stabilization of the incoming initiating nucleotide. The activity of clinically significant PrimPol variants with substitutions in the C-terminal domain was also studied in the work.

Праймаза-полимераза PrimPol человека, открытая в 2013 г., относится к суперсемейству архей-эукариотических праймаз (АЭП) и играет важную роль в поддержании стабильности генома. PrimPol является единственной ДНК-полимеразой (ДНКП) человека, способной инициировать синтез ДНК *de novo*, используя dNTP, в результате чего образуются ДНК-праймеры, которые могут быть использованы другими ДНКП. Основная функция PrimPol в клетке заключается в ре-инициации синтеза ДНК на поврежденных участках, когда активность репликативной ДНКП оказывается заблокирована повреждением.

Каталитический центр PrimPol располагается в N-концевом домене, однако С-концевой домен играет ключевую роль в механизме синтеза ДНК *de novo* благодаря наличию двух мотивов: ZnFn (мотив цинкового пальца) и RBD (RPA-binding domain). Структура PrimPol с С-концевым доменом не расшифрована, и его точная роль в катализе пока не ясна. В данной работе мы провели анализ роли С-концевого домена в праймазной активности PrimPol с использованием набора точечных мутаций и делеций ZnFn и RBD.

Было показано, что замены остатков Arg417 и Arg424 на аланин ZnFn приводят к снижению праймазной активности PrimPol, но не влияют на ДНК-полимеразную активность. С помощью моделирования было продемонстрировано, что остатки Arg417 и Arg424 мотива ZnFn образуют контакты с трифосфатом инициаторного нуклеотида gATP, и участвуют в его стабилизации в активном центре PrimPol.

С помощью метода торможения в геле было показано, что С-концевой мотив RBD регулирует активность PrimPol за счёт изменения аффинности фермента к ДНК. PrimPol с удаленным мотивом RBD обладает более вы-

* Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-14-00354 («Механизм праймазной активности PrimPol») и № 22-24-20150 («Полиморфные варианты PrimPol»).

© Е. О. Болдинова, А. Г. Барановский, Ю. В. Филина, Р. Р. Мифтахова, А. А. Манукян, Т. Тагиров, А. В. Макарова, 2023

сокой аффинностью к ДНК-субстрату по сравнению с белком дикого типа. При этом PrimPol образует комплексы с ДНК и регуляторным белком RPA только при наличии RBD-домена, при удалении данного домена комплексы PrimPol-ДНК-RPA не образуются. Регуляторный белок RPA необходим для привлечения PrimPol в репликативную вилку и стимуляции активности фермента. Мы предполагаем, что свободный RBD мешает связыванию PrimPol с ДНК или инициаторным гАТР, а взаимодействие с регуляторным белком RPA «активирует» PrimPol, повышая сродство к ДНК.

В ходе исследования также были биохимически охарактеризованы полиморфизмы и редкие варианты PrimPol с заменами в С-концевом домене, обнаруженные у пациентов с онкологическими заболеваниями: N421K в ZnFn, V546E и D547N в RBD. Замена N421K привела к значительному снижению ДНК-праймазной активности PrimPol, но не повлияла на эффективность и точность работы ДНК-полимеразы. При этом снижения эффективности связывания ДНК-субстрата с праймером, содержащим инициаторный нуклеотидтрифосфат, не наблюдалось. Замены V546E и D547N в RBD-мотиве не влияли на эффективность и точность ДНК-полимеразной и ДНК-праймазной активности PrimPol. Замены V546E и D547N также не влияли на связывание PrimPol с белком RPA и не нарушали активацию PrimPol белком RPA.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-301

**НЕЙРОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЦИНКА ПРИ ГЛАУКОМЕ:
РОЛЬ ФАКТОРА ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ*****NEUROTOXIC EFFECT OF ZINC IN GLAUCOMA:
ROLE OF PIGMENT EPITHELIUM-DERIVED FACTOR**Т. К. Булгаков¹, Н. Г. Шебардина¹, Е. Ю. Зерний¹, А. А. Вологжанникова², М. П. Шевелева², В. Е. Бакшеева³¹*НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*²*Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино*³*Институт нейрофизиопатологии, Университет Экс-Марсель, Франция*T. K. Bulgakov¹, N. G. Shebardina¹, E. Yu. Zernii¹, A. A. Vologzhannikova², M. P. Shevelyova², V. E. Baksheeva³¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University*²*Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino*³*Institut Neurophysiopathologie, INP, Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales,
Aix Marseille Univ, Marseille, France*

✉ locusts2001@gmail.com

Аннотация

Недавние исследования показали, что гибель ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) при глаукоме может быть связана с резким повышением концентрации мобильного цинка. Настоящая работа посвящена идентификации и характеристике секретируемых Zn²⁺-связывающих сигнальных белков сетчатки, опосредующих цитотоксические эффекты цинка.

Abstract

Recent studies have demonstrated that retinal ganglion cell (RGC) death in glaucoma may be associated with an acute increase of mobile zinc. Our work is devoted to the identification and characterization of secreted Zn²⁺-binding retinal signal proteins, which may mediate cytotoxic effects of zinc.

Глаукома — нейродегенеративное заболевание, ассоциированное с повреждением зрительного нерва и гибелью ГКС. Согласно последним данным, нейротоксический эффект при глаукоме может быть опосредован ионами мобильного цинка, секретируемого амакриновыми клетками [1]. Мишенями цинка могут служить секретируемые белки сетчатки, относящиеся к сигнальным системам клетки, в частности, нейротропные факторы, контролируемые выживаемость нейронов. Известно, что благодаря биомеханическим особенностям глаза белки, секретируемые сетчаткой, накапливаются в водянистой влаге (ВВ), где могут быть идентифицированы [2]. В соответствии с этим целью настоящей работы является поиск и характеристика Zn²⁺-связывающих сигнальных белков ВВ как внеклеточных медиаторов цитотоксических эффектов цинка при глаукоме.

На основе биоинформатического анализа протеома ВВ обнаружено 120 белков, потенциально способных связывать цинк, среди которых выявлен один сигнальный белок — нейротропный фактор пигментного эпителия сетчатки PEDF [3], который был отобран для дальнейшего анализа. Для экспрессии рекомбинантного PEDF получена кДНК этого белка на основе тотальной мРНК клеток ретинобластомы человека линии Y79. Целевой белок наработан с помощью экспрессии полученной конструкции в клетках штамма *E. coli*, очищен до гомогенного состояния с применением анионообменной и аффинной хроматографий, а также избавлен от примесей Zn²⁺ с помощью инкубации в присутствии ЭДТА и последующим отделением хелатного комплекса методом гель-фильтрации. Методами изотермической калориметрии титрования и атомно-адсорбционной спектроскопии выявлено, что белок способен высокоаффинно взаимодействовать с цинком. С помощью исследования флуоресценции бис-АНС в присутствии PEDF показано, что взаимодействие с Zn²⁺ сопровождается конформационными изменениями сигнального типа. Методом исследования спектроскопии кругового дихроизма охарактеризована вторичная структура PEDF и определено, что связывание цинка не оказывает влияния на нее. С помощью papoDSF показано, что взаимодействие белка с цинком приводит к конформационным перестройкам, связанных с умеренным снижением его температуры плавления. Исследование динамического светорассеяния показало формирование

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-15-00123.

функционального Zn^{2+} -связанного олигомера PEDF при заполнении высокоаффинных сайтов, в то время как низкоаффинное связывание приводит к агрегации белка. С помощью модели на клетках ретинобластомы человека Y79 охарактеризован цитотоксический эффект цинка. Так, методом проточной цитофлуориметрии выявлено, что клетки погибают в следствие цинк-индуцированного апоптоза. При этом они активно секретируют эндогенный нейротропный фактор PEDF в среду в ответ на цинковый стресс. Кроме того, изучено цитопротекторное воздействие рекомбинантного PEDF. Наконец, показано, что в условиях цинкового стресса наблюдается снижение нейротропной активности белка.

На основе полученных данных высказано предположение, что PEDF является Zn^{2+} -сенсорным сигнальным белком, однако высокие концентрации цинка могут оказывать дестабилизирующее воздействие на его структуру и защитную функцию.

Литература

1. Li Y., Andereggen L., Yuki K. et al. Mobile zinc increases rapidly in the retina after optic nerve injury and regulates ganglion cell survival and optic nerve regeneration // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. Vol. 114(2). P. E209–E218.
2. Kodeboyina S. K., Lee T. J., Churchwell, L., Ulrich L. et al. The Constitutive Proteome of Human Aqueous Humor and Race Specific Alterations // *Proteomes*. 2020. Vol. 8. P. 34.
3. Lee S. J., Duncan D. Pressure-Induced Alterations in PEDF and PEDF-R Expression: Implications for Neuroprotective Signaling in Glaucoma // *J. of Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2015. Vol. 06(05).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-302

**ИНДУКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ
НА АЛЛОАНТИГЕНЫ ТРАНСПЛАНТАТА В МОДЕЛИ КОЖНОГО ЛОСКУТА
С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК
И ИНГИБИТОРА ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ 8/19***

**INDUCTION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE TO GRAFT ALLOANTIGENS
IN SKIN FLAP MODEL USING TRANSFECTED DENDRITIC CELLS
AND AN INHIBITOR OF CYCLIN-DEPENDENT KINASES 8/19**

А. С. Булыгин, М. С. Фишер, В. В. Курилин, Ю. Н. Хантакова, С. В. Сенников

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

A. S. Bulygin, M. S. Fisher, V. V. Kurilin, Yu. N. Khantakova, C. V. Sennikov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ aleksej.bulygin95@mail.ru

Аннотация

Индукция трансплантационной толерантности за счет индукции донор-специфических Т-клеток через применение толерогенных ДК и аг-Трег может дать дополнительные возможности с преодолением проблемы отторжения органов при трансплантации. При введении ДК трансфицированных ДНК-конструкциями и аг-Трег полученные при стимуляции AS2863619, увеличивалась пролонгация сроков отторжения пересаженного кожного лоскута по сравнению с контрольной группой.

Abstract

The induction of transplantation tolerance through the induction of donor-specific T cells with tolerogenic DCs and ar-Tregs may provide additional opportunities to overcome the problem of organ rejection during transplantation. With the introduction of DC transfected with DNA constructs and anti-Treg obtained by stimulation with AS2863619, the prolongation of the rejection of the transplanted skin flap increased compared to the control group.

Трансплантационная толерантность — это состояние, характеризующееся отсутствием у реципиента деструктивного иммунного ответа на хорошо функционирующий донорский аллотрансплантат, с полностью интактной иммунной системой и отсутствием экзогенной иммуносупрессии. Как и ауто толерантность, толерантность к трансплантации достигается за счет контроля реактивности Т-клеток как центральными (толерогенные дендритные клетки), так и периферическими (индукция антиген-специфических Т-регуляторных клеток) механизмами. Дендритные клетки (ДК) играют центральную роль в инициации и контроле ответов, регулируя баланс между толерантностью и иммунитетом. Толерогенные ДК играют важную роль в поддержании толерантности путем индукции делеции клональных Т-клеток и анергии Т-клеток, ингибирования ответов эффекторных Т-клеток памяти и образования и активации регуляторных Т-клеток. Аллореактивные Т-клетки вносят важный вклад в отторжение трансплантата, и более четкое понимание механизмов, с помощью которых эти клетки распознают донорские антигены — прямым, непрямым или полупрямым путями — облегчит их терапевтическое нацеливание. Реакция отторжения после праймирования Т-клеток также может быть изменена путем нацеливания на пути, которые регулируют транспортировку Т-клеток, цитокины выживания или активацию врожденного иммунитета. Более того, количество и качество донор-реактивных Т-клеток памяти имеют решающее значение для аллоиммунных ответов. Таким образом, понимание фундаментальных (и потенциально уникальных) иммунологических путей, ведущих к отторжению аллотрансплантата, является предпосылкой для рациональной разработки терапевтических средств, способствующих толерантности к трансплантации.

Целью исследования явилось изучение пролонгации кожного лоскута с помощью введения толерогенных дендритных клеток и антиген-специфических Т-регуляторных клеток в условиях *in vivo*.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-10089).

© А. С. Булыгин, М. С. Фишер, В. В. Курилин, Ю. Н. Хантакова, С. В. Сенников, 2023

Материал и методы

CD4+лимфоциты и плазмацитоидные дендритные клетки (пДК) получали путем культивирования спленоцитов и клеток костного мозга мышей Balb/c и C57Bl/6 соответственно. Далее пДК трансфицировали ДНК-конструкциями, кодирующие CCR9, IL-10 и эпитопы МНС и вводили мышам. В свою очередь, из лимфоцитов получали аг-Трег с помощью со-культивирования спленоцитов с аллогенными дендритными клетками с последующей культивирование CD4+лимфоцитов с AS2863619, после чего уже полученные аг-Трег вводили мышам. На 30-е сутки после введения мышам линии C57Bl/6 и BALB/c трансплантировали кожный лоскут от мышей CBA и C57Bl/6 соответственно. Прооперированные мыши находились со свободным доступом к корму и воде. Смена повязок осуществлялась по мере износа и в дни оценки отторжения трансплантата. Отторжение трансплантата оценивали по некротическим изменениям кожного лоскута каждый день начиная с 7-х суток после трансплантации. Кожный лоскут, некротизированный на 80 % считался отторгшимся. Кожные лоскуты некротизированные до 7-х суток считались неудачно трансплантированными и не включались в анализ.

Результаты исследования

Трансплантации кожного лоскута в моделях CBA(донор)xC57Bl/6(реципиент) и C57Bl/6(донор)xBalb/c(реципиент) при внутривенном введении реципиентам полученных трансфицированных ДК и Ag-Трег за 7 дней до операции. Введение трансфицированных пДК значительно увеличивали пролонгацию сроков отторжения пересаженного кожного лоскута по сравнению с контрольной группой, которым вводили физ. р-р. (медиана времени отторжения — 11,5 суток). Полученные при стимуляции AS2863619 Ag-Трег, способны обуславливать значимое увеличение сроков отторжения пересаженного кожного лоскута мышей C57Bl/6 (медиана времени отторжения — 15 суток). При этом в экспериментальной группе (Balb/c (реципиент) + кожный лоскут C57Bl/6 (донор)+Ag-Трег сроки отторжения сопоставимы со сроками отторжения в контрольных группах при введении физиологического раствора (медиана времени отторжения — 12 суток).

Таким образом, полученные трансфицированные ДК и Ag-Трег приводили к подавлению реакции отторжения в модели трансплантации кожного лоскута на 7-е сутки после введения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-303

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ МИКРОРНК, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ РЕГУЛИРУЕТСЯ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ, В ОБРАЗЦАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО***INVESTIGATION OF MICRORNA LEVELS, THE EXPRESSION OF WHICH IS REGULATED BY THE ARYL HYDROCARBON RECEPTOR, IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER**И. С. Валембахов¹, О. Д. Бирюкова¹, В. В. Конончук¹⁻³, Т. С. Калинина¹¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск²НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск³Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, НовосибирскI. S. Valembakhov¹, O. D. Biruikova¹, V. V. Kononchuk¹⁻³, T. S. Kalinina¹¹*Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk*²*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk*³*Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk*

✉ i.valembahov@g.nsu.ru

Аннотация

В данной работе был исследован с помощью ПЦР профиль экспрессии микроРНК, регулируемых арил-гидрокарбонным рецептором (AhR) среди пациентов с НМРЛ (аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком), а также изучалась их связь с клинико-патологическими параметрами. Для микроРНК-21, -93, -146a, -181a и -342 была выявлена связь их экспрессии со статусом курения, PD-L1, размером опухоли и наличием метастазов у пациентов с НМРЛ.

Abstract

In this work, the expression profile of miRNAs regulated by the aryl-hydrocarboxylic receptor (AhR) among patients with NSCLC (lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma) was studied using PCR, and their relationship with clinicopathological parameters was studied. For microRNA-21, -93, -146a, -181a, and -342, their expression was found to be related to smoking status, PD-L1, tumor size, and the presence of metastases in patients with NSCLC.

Рак легкого (РЛ) — один из самых распространенных типов рака. 80–85 % случаев РЛ представлено немелкоклеточным РЛ (НМРЛ), который делится на следующие подтипы: аденокарцинома (АКЛ), плоскоклеточный РЛ (ПКРЛ) и крупноклеточный РЛ. ПКРЛ и АКЛ — наиболее распространенные подтипы НМРЛ. Считается, что до 90 % случаев РЛ обусловлено курением. Одним из подтипов с наиболее высокой связью с курением является ПКРЛ. Наименьшая связь с курением в большинстве исследований выявлена для АКЛ [1, 2]. Содержащийся в табачном дыме бензпирен активирует арил-гидрокарбонный рецептор (AhR), что инициирует экспрессию генов-мишеней AhR, многие из которых кодируют белки, принимающие участие в канцерогенезе. Например, одной из известных мишеней AhR является ген PD-L1, повышенная экспрессия которого позволяет опухолевым клеткам ускользать от иммунного ответа. Корректное определение экспрессионного статуса PD-L1 при РЛ чрезвычайно важно для определения тактики лечения рака, поскольку ингибирование PD-L1 — один из способов лечения РЛ. Помимо белок-кодирующих генов, среди мишеней AhR могут быть и микроРНК-кодирующие гены. МикроРНК (miRs) активно исследуются ввиду их важной роли в патологических процессах.

Целью работы стало исследование экспрессии AhR и микроРНК-кодирующих генов-мишеней AhR при ПКРЛ и АКЛ. Для этого с помощью ресурса ChIP-X Enrichment Analysis были отобраны микроРНК, экспрессия которых может регулироваться AhR, и с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени оценен уровень их экспрессии в образцах нормальных и опухолевых тканей легких ($n = 120$). Для miR-21, -93, -342 была выявлена зависимость от статуса курения при АКЛ: у некурящих пациентов уровни этих микроРНК были выше, что может быть обусловлено работой репрессора AhR у курящих пациентов. У курящих пациентов с АКЛ экспрессия miR-21, -342 положительно коррелировала с экспрессией AhR. Для miR-181a была выявлена ассоциация с размером опухоли и наличием метастазов в лимфатических узлах у пациентов с ПКРЛ (более низкие уровни у пациентов с метастазами). Наконец, при ПКРЛ выявлена положительная ассоциация уровней

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-15-00065.

экспрессии miR-93 и -181a с экспрессией PD-L1, а при АКЛ — положительная ассоциация уровней экспрессии miR-21, -146a, -342.

Таким образом, для ряда микроРНК-мишеней AhR выявлена связь их экспрессии со статусом курения, PD-L1, размером опухоли и наличием метастазов у пациентов с НМРЛ.

Литература

1. Barbone F., Bovenzi M., Cavallieri F., Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men // *Chest*. 1997. Vol. 112. P. 1474–1479.

2. Yun Y.H., Lim M.K., Jung K.W. et al. Relative and absolute risks of cigarette smoking on major histologic types of lung cancer in Korean men // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005. Vol. 14. P. 2125–2130.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-304

**ВКЛАД ЛЕПТИНА И ИНСУЛИНА В РЕГУЛЯЦИЮ ПЛОТНОСТИ
СИНАПТИЧЕСКИХ АМПА-РЕЦЕПТОРОВ ГИППОКАМПА *****THE CONTRIBUTION OF LEPTIN AND INSULIN TO THE REGULATION
OF THE DENSITY OF SYNAPTIC AMPA RECEPTORS IN THE HIPPOCAMPUS**С. О. Вечкапова^{1,2}, А. Л. Проскура¹¹Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Новосибирск²Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава РоссииS. O. Vechkapova^{1,2}, A. L. Proskura¹¹Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Novosibirsk²Novosibirsk State Medical University

✉svetavech@yandex.ru

Аннотация

В работе рассматриваются молекулярные механизмы сигнальных путей рецепторов инсулина и лептина, участвующие в процессах регуляции плотности синаптических АМПА-рецепторов в поле СА1 гиппокампа. Предложенная реконструкция молекулярных событий позволяет оценить вклады инсулина и лептина в синаптическую пластичность и поддержание баланса возбуждения торможения в нейронных сетях гиппокампа при реализации высших когнитивных функций.

Abstract

In these theses we consider the molecular mechanisms of the insulin and leptin receptor signaling pathways involved in the regulation of the density of synaptic AMPA receptors in the CA1 field of the hippocampus. The proposed reconstruction of molecular events makes it possible to evaluate the contributions of insulin and leptin to synaptic plasticity and maintaining the balance of excitation and inhibition in the neural networks of the hippocampus during the implementation of higher cognitive functions.

Лептин и инсулин задействованы в обеспечении метаболизма организма и контроля веса тела. Их рецепторы хорошо представлены в мозге, в частности, на синапсах пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа, и вовлечены в регулирование синаптической пластичности. Эффективность нейротрансмиссии определяется плотностью АМПАР (рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) на дендритных шипиках.

Целью работы было реконструировать молекулярные механизмы регулирования плотности глутаматных рецепторов в зоне синаптических контактов, обеспечивающих эффективность синаптической передачи в гиппокампе под влиянием периферических гормонов — лептина и инсулина.

Для анализа и обобщения литературных данных, а также реконструкции белок-белковых взаимодействий использовалась технология GeneNet на основании открытых источников базы PubMed.

Инсулин совместно с белком IRS2 (субстрат инсулинового рецептора, insulin receptor substrate 2) запускают сигнальный каскад фосфоинозитол-3-киназы (ФИЗК) через закрепление на своих цитоплазматических участках регуляторной субъединицы P85 путем прямого связывания с определенными фосфорилированными остатками тирозина: инсулин \rightarrow IR-A \rightarrow IRS \rightarrow IRS γ -P85. Таким образом, происходит формирование активной формы ФИЗК, которая обеспечивает накопление на мембране фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфатов (ФИФ3). Эти вторичные посредники служат сайтами закрепления фосфоинозитид-зависимой киназы-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1) на плазматической мембране, которая фосфорилирует каталитический домен протеинкиназы C (ПКС). ПКС фосфорилирует сериновый остаток S880 субъединиц GluR2-АМПАР, что приводит к ослаблению их закрепления на постсинаптической мембране и выходу из зоны синапса.

У лептинового рецептора (ЛР) отсутствует мотив YXXM, который необходим для закрепления регуляторной субъединицы ФИЗК. На основании анализа парного выравнивания SH2 доменов белков из базы данных GeneNet, которые вовлечены в передачу сигналов НМДАР и ЛР, был предположен механизм реализации эффектов лептина. На синапсах может происходить ассоциация сигналов от ЛР и НМДАР (рецептор N-метил-D-аспартата) через нерепторную протеинкиназу Fyn, которая обладает SH2 доменом, и присутствует в составе НМДАР макрокомплексов. Первичная последовательность SH2-Fyn имеет высокую степень схожести с SH2 до-

* Работа выполнена при поддержке базового проекта фундаментальных исследований 122010800028-4 (ЕГИСЦ).
© С. О. Вечкапова, А. Л. Проскура, 2023

меном белков, взаимодействующими с фосфотирозинами ЛР. Fyn напрямую взаимодействует с p85, обеспечивая ее пространственное сближение с каталитической субъединицей ФИЗК. Субстратом Fyn может выступать GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta), которая наряду с киназой 2 деактивирует PTEN, что наблюдается при опосредуемом лептином увеличении плотности АМПАР на синапсах.

Предложенная нами гипотеза о вкладе нерецепторной протеинкиназы Fyn в пересечение сигнальных путей глутаматных и лептиновых рецепторов объясняет описанные в литературе экспериментальные данные о пропотенцирующем эффекте лептина на развитие долговременной потенциации в гиппокампе, сопровождаемое накоплением PIP3 [1]. Непродолжительное воздействие инсулина в эксперименте, напротив, способствовало развитию депрессии в поле CA1 гиппокампа вследствие эндоцитоза GluR2-АМПАР, что не было связано с активностью ионотропных глутаматных НМДА рецепторов [2].

Таким образом, ключевой точкой в реализации эффектов инсулина и лептина в синапсах гиппокампа является активация ФИЗК и накопление ее продукта — ФИФ3. При этом инсулин снижает эффективность синаптической передачи через выведение АМПАР из синапса, а лептин способствует переходу эффективности синаптической передачи более высокий уровень за счет обеспечения дополнительного пула готовых войти в синапс АМПАР.

Литература

1. Moulton P. R., Cross A., Santos S. D. et al. Leptin regulates AMPA receptor trafficking via PTEN inhibition // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. P. 4088–4101.
2. Huang C. C., Lee C. C., Hsu K. S. An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus // J. Neurochem. 2004. Vol. 89. P. 217–231.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-305

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОНИКАЮЩЕГО В КЛЕТКУ ПЕПТИДА И ПЕГИЛИРОВАННЫХ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК НА *IN VITRO* МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА**CELL-PENETRATING PEPTIDE AND CATIONIC LIPOSOMES MEDIATED siRNA DELIVERY TO ARREST GROWTH OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CELLS *IN VITRO***В. В. Высочинская^{1,2}, Я. А. Забродская^{1,2}, О. В. Довбыш², М. А. Егорова¹, М. А. Маслов³¹ НИИ группа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого³ МИРЭА — Российский технологический университет, МоскваV. V. Vysochinskaya^{1,2}, Y. A. Zabrodskaya^{1,2}, O. V. Dovbysh², M. A. Egorova¹, M. A. Maslov³¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University³ MIREA — Russian Technological University, Moscow

✉ veravv2509@gmail.com

Аннотация

При оценке проникающего в клетку пептида EB1 и оригинальных пегелированных катионных липосом 2X3-DOPE-PEG в качестве средств доставки анти-*BCR-ABL* миРНК на *in vitro* модели хронического миелолейкоза, показано, что катионные липосомы 2X3-DOPE-PEG эффективнее доставляют миРНК в клетки K562, что приводит к более выраженному подавлению экспрессии целевого онкогена и ингибированию пролиферации опухолевых клеток.

Abstract

Comparison of the cell-penetrating peptide EB1 and original 2X3-DOPE-PEG cationic liposomes for anti-*BCR-ABL* siRNA delivery into cells of chronic myeloid leukemia showed that 2X3-DOPE-PEG cationic liposomes deliver siRNA more efficiently into K562 cells, that leads to more effective inhibition of expression of the targeted gene and cancer cell proliferation.

Применение малых интерферирующих РНК (миРНК) для специфического подавления экспрессии генов-мишеней с терапевтической целью является перспективным направлением разработки таргетных лекарственных препаратов в отношении широкого спектра заболеваний, включая онкогематологическое заболевание — хронический миелолейкоз (ХМЛ). Малые интерферирующие РНК (миРНК), направленные против мРНК химерного онкогена *BCR-ABL*, образование которого лежит в основе патогенеза ХМЛ и приводит к злокачественной трансформации клеток, могут быть использованы в качестве дополнительного средства к традиционной терапии. Однако для успешного внедрения в клиническую практику технологий на основе миРНК основной задачей остается разработка эффективной системы их доставки в клетки-мишени.

Перспективными средствами доставки миРНК являются катионные липосомы и проникающие в клетку пептиды, которые за счет своего положительного заряда взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами миРНК и обеспечивают доставку миРНК в клетки. В настоящем исследовании нами были использованы и сравнены в качестве средств доставки миРНК проникающий в клетку эндосомолитический пептид EB1 и оригинальные катионные липосомы на основе катионного амфифила 1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетразагексакозан тетрагидрохлорида (2X3) и цвитерионного липида 1,2-ди-О-олеилфосфатидилэтаноламина (DOPE), модифицированных DSPE-PEG₂₀₀₀ (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000]) (2X3-DOPE-PEG).

В качестве противоопухолевой миРНК была использована синтетическая миРНК, специфичная последовательности мРНК химерного онкогена *BCR-ABL*. В работе была оценена эффективность доставки миРНК в клетки эритромиелолейкоза человека линии K562 в комплексе с исследуемыми носителями и механизм проникновения данных комплексов. Эффективность трансфекции, а также механизм интернализации миРНК в комплексе с носителями оценивались с использованием методов проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии, и было показано, что проникающий в клетки пептид и пегелированные катионные липосомы эффективно доставляют миРНК в клетки K562 путем эндоцитоза. При этом пегелированные катионные липосомы демонстрируют

более высокую эффективность трансфекции и более эффективное высвобождение миРНК из эндосом. Для оценки терапевтического эффекта исследуемых комплексов были оценены эффективность подавления экспрессии гена *BCR-ABL* методом ПЦР-РВ и антипролиферативный эффект на клетках K562 с использованием MTS-теста. Уровень мРНК онкогена *BCR-ABL* в клетках K562, а также метаболическая активность опухолевых клеток, выраженная в процентах от контроля, значительно снижается после трансфекции исследуемых комплексов через 24, 48 и 72 часа от момента трансфекции, при этом использование катионных липосом приводит к более выраженному эффекту.

Комплексы на основе пегелированных катионных липосом 2X3-DOPE-PEG и *BCR-ABL* миРНК могут быть предложены в качестве новой противоопухолевой композиции для дальнейшего исследования противоопухолевой эффективности на *in vivo* модели ХМЛ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-306

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА (IGF-IR) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА***STUDY OF MECHANISMS OF ACTIVATION OF THE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR (IGF-IR) USING MUTANT FORMS OF THE RECEPTOR**А. А. Гавриленкова^{1,2}, И. Е. Деев², Э. В. Бочаров^{1,2}, И. С. Охрименко¹, О. В. Серова²¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный²Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, МоскваA. A. Gavrilenkova^{1,2}, I. E. Deev², E. V. Bocharov^{1,2}, I. S. Okhrimenko¹, O. V. Serova²¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ alycat1008@gmail.com

Аннотация

На данный момент проводится много исследований по изучению механизмов активации семейства рецептора инсулина, но точные механизмы конформационных изменений рецепторов при активации до сих пор выясняются. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулина находятся в конформации, препятствующей взаимодействию киназных доменов. Связывание с лигандом, меняет конформацию рецептора, в результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и вызывают клеточный ответ.

Abstract

At the moment, a lot of research is being conducted to study the mechanisms of activation of the insulin receptor family, but the exact mechanisms of conformational changes in receptors during activation are still being investigated. It is assumed that in the inactive state, the TM domains of the insulin receptor are in a conformation that prevents the interaction of kinase domains. Binding to the ligand changes the conformation of the receptor, as a result, intracellular tyrosine kinase domains converge and cause a cellular response.

Для того чтобы изучить роль трансмембранного домена в активации рецептора IGF-IR, нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие двойные замены в трансмембранном домене. Клетки линии НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IGF-IR с заменами V941E-A942R; V948E-G949R; G949E-G950R. Затем клетки инкубировали в среде F-12 с добавлением инсулиноподобного фактора роста-1, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к фосфорилированной и общей форме рецептора. В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутантные формы IGF-IR V941E-A942R и V948E-G949R не экспрессировались в клеточной линии НЕК293. Двойная замена G949E-G950R приводила к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии инсулиноподобного фактора роста-1. Мы предполагаем, что двойная замена G949E-G950R приводит к стабилизации димера рецептора в активной конформации, за счет образования солевых мостиков между аргинином и глутаминовой кислотой в трансмембранном домене и, как следствие, к автофосфорилированию внутриклеточных частей рецептора в отсутствие лиганда.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IGF-IR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут приводить к изменению характера активации рецептора.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-74-00024.

© А. А. Гавриленкова, И. Е. Деев, Э. В. Бочаров, И. С. Охрименко, О. В. Серова, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-307

**ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИНИЙ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*****ALTERATION OF THE TRANSCRIPTOME OF GENETICALLY MODIFIED BREAST CANCER LINES**К. А. Гаптулбарова¹⁻³, К. В. Невская³, Д. С. Цыденова^{1,2}, Д. С. Долгашева^{1,2}, А. Г. Першина³, Н. В. Литвяков^{1,3}¹НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН²Томский государственный университет³Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, ТомскK. A. Gaptulbarova¹⁻³, K. V. Nevskaya³, D. S. Tsydenova^{1,2}, D. S. Dolgasheva^{1,2}, A. G. Pershina³, N. V. Litviakov^{1,3}¹Cancer Research Institute, Tomsk²Tomsk State University³Siberian State Medical University, Tomsk

✉ xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Аннотация

Ранее нами была показана ассоциация способности опухолевых клеток к дедифференцировке до стволовых клеток в зависимости от количества амплификаций генов стволовости, которые обуславливают их гиперэкспрессию. Клеточная линия рака молочной железы BT549 имеет одну амплификацию гена стволовости *KLF5* и самую низкую из всех стандартных опухолевых линий молочной железы способность к дедифференцировке с образованием маммосфер. В свое время для клеточной линии MDA-MB231 характерно наличие амплификаций гена *MYC* и высокая способность к дедифференцировке с образованием маммосфер. С помощью метода CRISPER/Cas9 были получены генетически-модифицированные клеточные линии BT549 и MDA-MB231 с высокой и низкой экспрессией гена *MYC* соответственно.

Abstract

We have previously shown an association of the ability of tumour cells to dedifferentiate to stem cells depending on the number of stemness gene amplifications that account for their overexpression. The breast cancer cell line BT549 has a single *KLF5* stemness gene amplification and the lowest ability to dedifferentiate to form mammospheres of any standard breast tumour line. In due course, the MDA-MB231 cell line was characterised by the presence of *MYC* gene amplifications and a high ability to dedifferentiate to form mammospheres. Using CRISPER/Cas9 method, genetically modified BT549 and MDA-MB231 cell lines with high and low *MYC* gene expression, respectively, were obtained.

Материал и методы

Исходная и модифицированная клеточные линии BT549 и MDA-MB были культивированы в полных питательных средах. Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Анализ данных осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты

Нами была генетически модифицирована исходная линия клеток BT549 и получена линия стабильно гиперэкспрессирующая ген *MYC* — BT549hyperMYC_clone9. При этом сортированные CD44-CD24- прогениторные клетки BT549hyperMYC_clone9 образовывали в 12 раз больше маммосфер даже без индукции IL6, в том время как прогениторные клетки исходной линии без индукции IL6 — единичные мелкие сфероиды (рис. 1, А-В). При индукции IL6 прогениторные клетки BT549hyperMYC_clone9 образовывали в 5 раз больше маммосфер и в 2,5 раза более крупные маммосферы, чем прогениторные клетки исходной линии BT549 с IL6 (рис. 1, В).

Был изучен транскриптомный профиль линии BT549. По данным микроматричного анализа экспрессия гена *MYC* повышалась в 5 раз, также значительно повышалась экспрессия *SMO*, *GATA3*, *LIFR*, а экспрессия генов *KLF5* и *SNAI2* была снижена по сравнению с исходной линией (рис. 2А). Также было проведено сравнение экспрессионного профиля модифицированной и исходной линий BT549. При этом экспрессия *SNAI2* снижена более чем в 15 раз, что свидетельствует об ингибировании EMT. Также было обнаружено, что в модифицированной линии, была повышена экспрессия 2957 генов (почти 2 тыс из них гены-мишени *MYC*) и снижена экспрессия 948 генов (рис. 2, Б).

* Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ № 075-15-2021-1073.

© К. А. Гаптулбарова, К. В. Невская, Д. С. Цыденова, Д. С. Долгашева, А. Г. Першина, Н. В. Литвяков, 2023

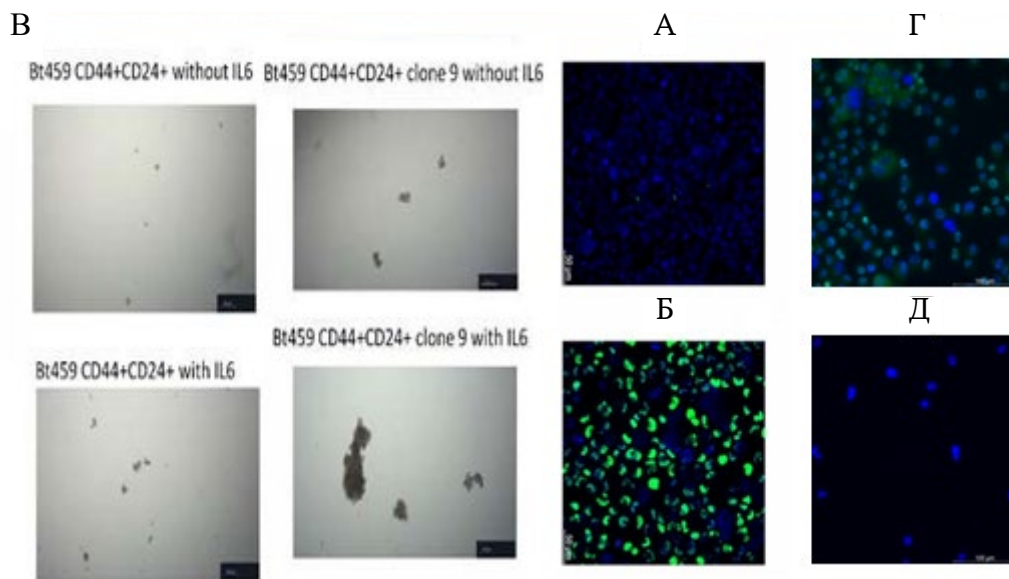


Рис. 1. Экспрессия белка Мус в клетках исходной линии BT549 (А) и клетках генетически модифицированной линии BT549hyperMyc_clone9 (Б); микрофотографии маммосфер (В); иммунофлуоресцентное окрашивание не трансфицированной, исходной клеточной линии MDA-MB231 (Г); моноклональная модифицированная линия MDA-MB-231_Мус6 (Д)

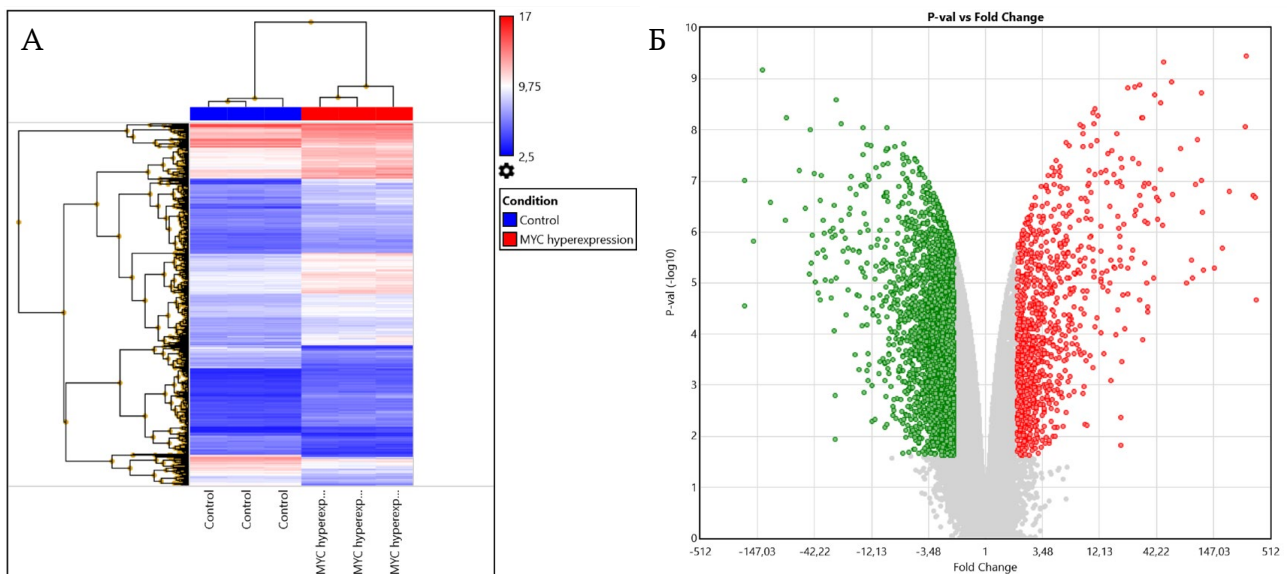


Рис. 2. Тепловая карта экспрессии гена MYC в модифицированной линии BT549: синим цветом — контроль; красным — гиперэкспрессия MYC (А); ДЭГ модифицированной линии BT549: зеленым цветом — Up-regulated, красным — Down-regulated (Б)

В результате анализа клеток исходной и модифицированной линий MDA-MB231, окрашенных антителами Anti-c-Myc, методом флуоресцентной микроскопии выявлена экспрессия белка гена MYC как в контрольной, так и в моноклональных клеточных линиях. Однако в трех трансфицированных линиях MDA-MB-231_Мус6, MDA-MB-231_Мус8 и MDA-MB-231_Мус10 сигнал флуоресценции был значительно ниже, чем во всех остальных линиях (рис. 1, Г, Д).

Так для клеток исходной линии характерно наличие амплификаций гена MYC, можно предположить, что редактированию подверглись не все копии гена MYC, что привело к не полному подавлению экспрессии гена. Продемонстрирована тенденция к снижению, но не к изменению количества образующихся маммосфер по сравнению с исходной клеточной линией. Средний диаметр маммосфер, образуемых клетками линии MDA-MB231_Мус6 меньше, чем у маммосфер, образуемых исходной клеточной линией.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-308

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ МЕТОДОМ *EX VIVO* ***EX VIVO CHARACTERISTICS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS**М. С. Гилева¹, Е. Г. Уфимцева², Л. Ф. Гуляева^{1,3}, В. В. Козлов⁴¹Новосибирский государственный университет²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск³Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск⁴Новосибирский областной клинический онкологический диспансерM. S. Gileva¹, E. G. Ufimceva², L. F. Gulyaeva^{1,3}, V. V. Kozlov⁴¹Novosibirsk State University²Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk³Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk⁴Novosibirsk Regional Clinical Oncological Dispensary

✉ gileva.rita@gmail.com

Аннотация

Поиск молекулярных маркеров для идентификации аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого остается актуальной проблемой. В работе впервые был использован *ex vivo* метод выделения клеток из образцов ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Были проанализированы потенциальные маркеры данного гистологического типа опухоли, а также оценивался клеточный состав иммунного микроокружения, в том числе в зависимости от статуса курения пациентов.

Abstract

The search for molecular markers for the identification of adenocarcinoma and squamous cell lung cancer remains an urgent problem. In this work, for the first time, an *ex vivo* method was used to isolate cells from tissue samples of patients with non-small cell lung cancer. Potential markers of this histological tumor type were analyzed, and the cellular composition of the immune microenvironment was also assessed, including depending on the smoking status of patients.

В 2020 г. рак легкого занял второе место по выявлению новых случаев в мире и стал наиболее распространенной причиной смерти от онкологических заболеваний. Подавляющее большинство случаев рака легкого (85 %) приходится на немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), среди которого чаще всего встречается аденокарцинома (40 %) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) (25 %). Важно различать эти подтипы, поскольку они имеют разные характеристики, схемы терапии и исходы. В лечении ПКРЛ достигнут успех при применении ингибиторов иммунных контрольных точек PD-L1, но данная тактика лечения применима не во всех случаях. Современный метод *ex vivo* позволяет охарактеризовать по молекулярным маркерам не только клетки опухоли, но и клетки опухолевого микроокружения. Однако такой подход не применялся для исследования НМРЛ.

Объектом исследования стали ткани и *ex vivo*-выделенные из них клетки из образцов НМРЛ и неопухлевой ткани легкого, полученных в ходе операций у пациентов с аденокарциномой легкого (8 чел.) и ПКРЛ (4 чел.) на базе НОКОД. 9 пациентов являлись курильщиками табака, 3 — не курили. Полученные в ходе работы гистологические и цитологические препараты в дальнейшем были окрашены по Романовскому–Гимза для оценки иммунного микроокружения, а также проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание на молекулярные маркеры: CK7, TTF1, PanCK, p40, Ki-67, AhR, AhRR, CYP1A1, PD-L1.

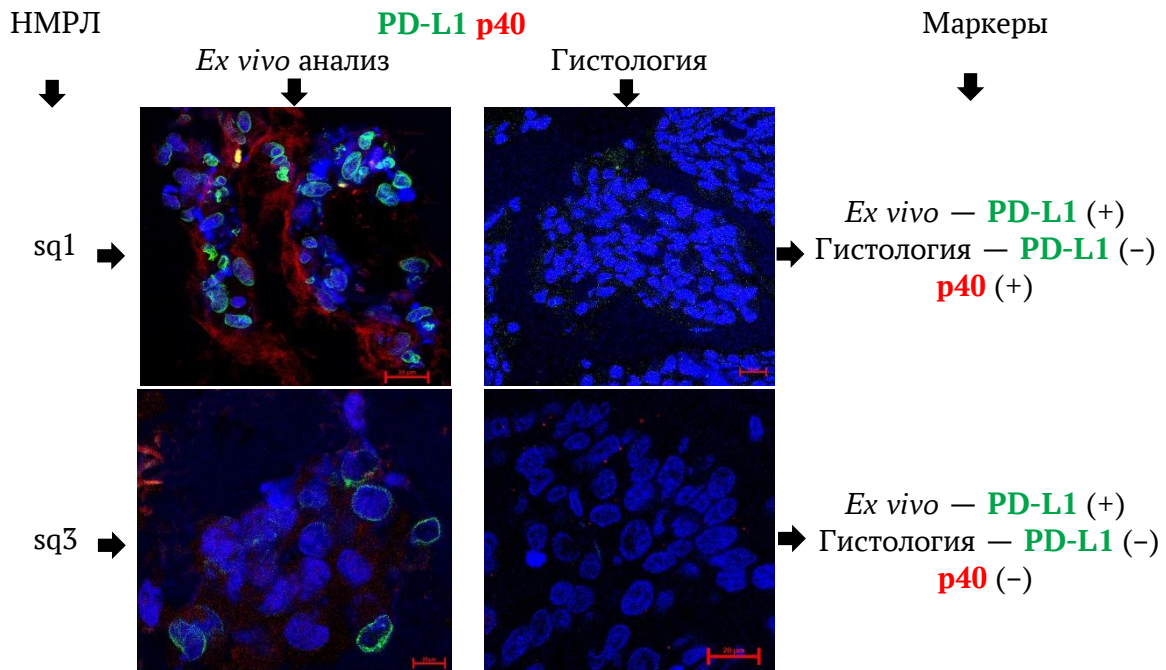
Наиболее значимым стало исследование экспрессии контрольных точек иммунного ответа (PD-1, PD-L1). Оценка экспрессии этих маркеров необходима для назначения иммунотерапевтического лечения.

В результате экспрессию PD-L1 раковыми клетками не обнаружили на всех гистологических срезах, исследованных в работе. Однако экспрессия PD-L1 раковыми клетками была определена с индексом TPS 10 % и 2 % при анализе *ex vivo* полученных цитопрепаратов из образцов, в которых при гистологическом анализе не была выявлена экспрессия этих маркеров. Это связано с преимуществом метода *ex vivo*, при котором в цито-

* Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-15-00065. Исследование проводилось с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ФТМ «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

логический препарат попадают все клетки образца ткани, в отличие от гистологических срезов. При небольшом индексе TPS вероятность определения экспрессии PD-L1 раковыми клетками выше при использовании метода *ex vivo*, чем при гистологическом анализе образцов НМРЛ, что критически важно для определения тактики лечения пациентов.

Другие маркеры, изучавшиеся нами, не показали 100 % чувствительности и специфичности для образцов НМРЛ, поэтому дальнейший их поиск должен продолжаться.



Иммунофлуоресцентная характеристика клеток по экспрессии PD-L1 раковыми клетками на *ex vivo* полученных цитопрепаратах и параллельно гистологических срезах тех же опухолей. Ядра клеток — синий сигнал.

Колоколизация красного и синего сигналов в ядрах — фиолетово-розовый сигнал.

Экспрессия маркера раковыми клетками: (+) — есть, (-) — нет

При анализе клеточного состава иммунного микроокружения было обнаружено, что макрофаги являются наиболее многочисленными клетками иммунного ответа для большинства исследованных образцов. Однако качественный и количественный состав иммунных клеток в опухолевом микроокружении даже в пределах одного гистологического подтипа опухоли был крайне гетерогенным, что указывает на необходимость персонализированного подхода к диагностике каждого пациента с НМРЛ.

Была оценена экспрессия маркеров: CD14, IFN γ , TNF α , IL4, IL10, FGFb, AhR, AhRR, CYP1A1, PD-L1 и PD-1, макрофагами как в опухолевом микроокружении, так и в неопухолевой ткани легкого тех же пациентов. По результатам анализа обнаружили, что все макрофаги в опухолевом микроокружении экспрессировали эти маркеры, то есть они были активированы.

В неопухолевой ткани легкого пациентов экспрессия маркеров макрофагами зависела от их статуса курения: у курящих макрофаги экспрессировали все маркеры, тогда как в образцах, полученных от некурящих пациентов, их экспрессии, за исключением CD14 рецепторане выявили.

Таким образом, разработанный метод *ex vivo* позволяет в короткие сроки дифференцировать и подтип опухоли, и охарактеризовать как раковые клетки, так и клетками иммунного ответа как по составу и по экспрессии ими различных маркеров. Метод *ex vivo* показал повышенную чувствительность при характеристике экспрессии PD-L1 раковыми клетками по сравнению с гистологическим анализом этого маркера.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-309

МОЛЕКУЛЯРНО-ВИДОВАЯ ДИАГНОСТИКА ТРУДНОДИФФЕРЕНЦИРУЕМЫХ ВИДОВ РОДА ТУПОНОСЫЕ БЫЧКИ: РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ПДРФ КЛЮЧЕЙ***MOLECULAR METHODS FOR IDENTIFYING SPECIES OF THE GENUS TUBENOSE GOBIES: CREATION AND APPLICATION OF PCR-PDF KEYS**

В. И. Головенчик, Е. С. Гайдученко, Т. П. Липинская

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск

V. I. Golovenchik, E. S. Gajduchenko, T. P. Lipinskaya

Scientific and Practical Center of the NAS of Belarus for Bioresources, Minsk

✉ vika.golovenchik@mail.ru

Аннотация

В работе приводятся данные о построении определительных таблиц для на основании гена *cytb* для определения видов рода Тупоносые бычки. В результате анализа гена было отобрано 7 подходящих рестриктаз из 232, которые позволяют определить каждый из изучаемых видов рыб рода Тупоносые бычки в ходе рестрикционного анализа. Для каждой рестриктазы были построены определительные ПЦР-ПДРФ таблицы и рестрикционные карты.

Abstract

The article presents data about construction of PCR-PDF keys based on *cytb* gene to identify species of the genus Tubenose gobies. As a result of the gene analysis, 7 suitable restriction enzymes out of 232 were selected. It is made it possible to identify each species of the genus Tubenose gobies during the restriction analysis. For each restriction enzyme, PCR-RFLP tables and restriction maps were constructed.

Чужеродный для территории Беларуси род Тупоносые бычки *Proterorhinus* Smitt, 1900 характеризуется сложной и до конца не установленной видовой структурой [1–4]. Последние исследования с применением современных методов молекулярной биологии показали наличие в данном роде критических видов, в частности: бычка-цуцка *P. marmoratus* (Pallas, 1814), западного тупоносого бычка *P. semilunaris* (Heckel, 1837) и каспийского бычка-цуцка *P. semipellucidus* (Kessler, 1877) [1, 3]. Данные виды невозможно отличить по морфологическим ключам, более того, они характеризуются схожей биологией [1, 2]. При этом корректная видовая идентификация является крайне важным этапом в вопросе изучения биоразнообразия в целом и биологических инвазий в частности. Поэтому в настоящее время требуется поиск новых простых и эффективных способов определения видов данного рода. Таким методом может стать определение видов с помощью молекулярно-генетических методов, в частности по ПЦР-ПДРФ таблицам. Как было показано авторами работы ранее [5] наиболее подходящим молекулярным маркером для построения ПЦР-ПДРФ таблиц является ген *cytb*.

Таким образом, целью настоящего исследования стала разработка на основе гена *cytb* ПЦР-ПДРФ ключей для молекулярно-видовой диагностики труднодифференцируемых видов рода Тупоносые бычки.

В ходе работы было проанализировано 30 последовательностей бычка-цуцка, 63 последовательности западного тупоносого бычка, 6 последовательности каспийского тупоносого бычка гена *cytb* длиной 603 п.н. Поиск сайтов рестрикции был проведен в программе BioEdit для ферментов, производимых компаниями Thermo Scientific и Fermental Internati, как наиболее доступных на белорусском рынке химических реактивов. Графические рестрикционные карты строили в программе CodonCode Aligner.

При построении рестрикционных карт учитывались ферменты, позволяющие отличить одновременно три вида, имеющие в последовательности гена не более двух сайтов рестрикции, как с длинными, так и с короткими сайтами узнавания, поскольку было решено, что образование в результате рестрикции большого числа коротких фрагментов может затруднять интерпретацию получаемых результатов. В дальнейшем из анализа были исключены рестриктазы отрезающие фрагменты длиной менее 50 пар нуклеотидов, что связано с низкой возможностью для точного определения длины коротких фрагментов в агарозном геле в условиях рутинного эксперимента, а также рестриктазы имеющие одинаковые сайты узнавания у трех исследуемых видов. Из анализа были также исключены ферменты, разрезающие ген в переменных сайтах.

* Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № Б20М-040.

© В. И. Головенчик, Е. С. Гайдученко, Т. П. Липинская, 2023

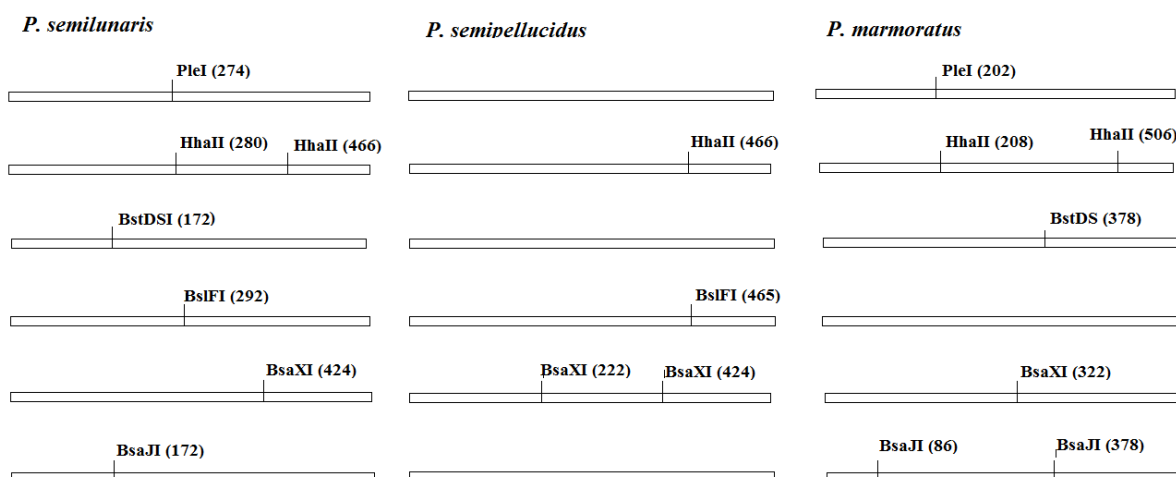
В результате первичного анализа было найдено 232 рестриктазы, имеющие не более двух сайтов узнавания у трех исследуемых видов. 225 из изученных рестриктаз были исключены из анализа, так как не соответствовали приведенным выше характеристикам. В итоге были отобраны 7 рестриктаз, сайты узнавания и их количество для которых приведены в табл. 1.

Таблица 1

Эндонуклеазы рестрикции гена *cutb*, которые были отобраны для видов рыб рода Тупоносые бычки

Фермент	Изошизомер	Сайт узнавания
BsaJI	BseDI, BssECI	C/CNNGG
BsaXI	-	ACNNNNNCTCC
BsIF1	BsmFI, FaqI	GGGAC
BstDSI	BtgI	C/CRYGG
HhaII	AspLEI, BstHNI, CfoI, GlaI, HhaI, Hin6I, HinP1I, HspAI, SscL1I	GCG/C
PleI	MlyI, Nt.Bst9I, Nt.BstNBI, PpsI, SchI	GAGTC
TspBI	-	CCRYGG

Для каждой из найденных рестриктаз была построена ПДРФ-карта, позволяющая идентифицировать все три вида рода Тупоносые бычки (см. рисунок).



ПДРФ карта для определения чужеродных видов рыб рода Тупоносые бычки

Для трех изучаемых чужеродных видов рыб рода Тупоносые бычки, включенных в анализ, была составлена общая ПДРФ-таблица (табл. 2), в которой представлены только рестриктазы, позволяющие однозначно идентифицировать каждый из видов.

Таблица 2

ПЦР-ПДРФ таблица на основе последовательности гена *cut b* для идентификации чужеродных видов рыб рода Тупоносые бычки

Вид/Рестриктаза	BsaJI	BsaXI	BsIF1
<i>P. marmoratus</i>	86, 292, 224	322, 280	n
<i>P. semilunaris</i>	172, 430	424, 178	292, 310
<i>P. semipellucidus</i>	n	222, 202, 178	465, 137
Вид/Рестриктаза	BstDSI	HhaII	PleI
<i>P. marmoratus</i>	378, 224	208, 300, 94	202, 400
<i>P. semilunaris</i>	172, 430	280, 186, 136	274, 328
<i>P. semipellucidus</i>	n	466, 136	n

Таким образом, в ходе данного исследования были построены ПЦР-ПДРФ таблицы для определения видов рыб рода Тупоносые бычки.

Литература

1. Neilson M. E., Stepien C. A. Evolution and phylogeography of the tubenose goby genus *Proterorhinus* (Gobiidae: Teleostei): evidence for new cryptic species // *Biol. J. Linnean Soc.* 2009. Vol. 96. P. 664–684.
2. Sorokin P. A. et al. Further studies of mitochondrial genome variability in ponto-caspian *Proterorhinus* species (Actinopterygii: Perciformes: Gobiidae) and their taxonomic implications // *Acta Ichthyologica et Piscatoria.* 2011. Vol. 41. P. 95–104.
3. Stepien C. A., Tumeo M. A. Invasion genetics of Ponto-Caspian gobies in the Great Lakes: a ‘cryptic’ species, absence of founder effects, and comparative risk analysis // *Biol. Invasions.* 2006. Vol. 8. P. 61–78.
4. Zarei F. et al. Mitochondrial phylogeny, diversity, and ichthyogeography of gobies (Teleostei: Gobiidae) from the oldest and deepest Caspian sub-basin and tracing source and spread pattern of an introduced *Rhinogobius* species at the tricontinental cross-road // *Hydrobiologia.* 2021. Vol. 848. P. 1267–1293.
5. Головенчик В. И., Гайдученко Е. С., Липинская Т. П. Генетическая вариабельность гена *cytb* у видов рыб рода *Proterorhinus* // Молодежь в науке — 2021: тезисы докладов Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых (Минск, 27 сентября — 30 сентября 2021 г.). Минск: Беларуская навука, 2021. С. 157–159.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-310

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ RAP-PHR ПЛАЗМИДЫ PBS72 БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS******MOLECULAR GENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE RAP-PHR SIGNALING SYSTEM
OF THE PLASMID PBS72 OF *BACILLUS SUBTILIS* BACTERIA**

А. С. Гуринович, М. А. Титок

Белорусский государственный университет, Минск

A. S. Gurinovich, M. A. Titok

Belarusian State University, Minsk

✉ ma_titok@bsu.by

Аннотация

Сигнальная система чувства кворума Rap-Phr плазмиды pBS72 характеризуется функциональными особенностями. При нарушении генов *rap-phr* в составе плазмиды pBS72 эффективность споруляции увеличивалась в 2 раза, а при конъюгационном переносе мутантной плазмиды количество клеток донора снижалось в 10 раз через 3 и 4 часа и в 100 раз через 24 часа скрещивания. Количество трансконъюгантов оставалось неизменным.

Abstract

The Rap-Phr quorum sensing signaling system of the pBS72 plasmid is characterized by functional features. When the *rap-phr* genes in the pBS72 plasmid were disrupted, the efficiency of sporulation increased 2-fold, and when the mutant plasmid was transferred conjugatively, the number of donor cells decreased 10-fold after 3 and 4 hours and 100-fold after 24 hours of crossing. The number of transconjugants remained unchanged.

Плазмиды, являясь необязательными структурами бактериальной клетки, способны обеспечивать содержащим их микроорганизмам адаптацию к стрессовым факторам внешней среды (в частности, влиять на образование спор и биопленок, участвовать в горизонтальном переносе генов) [1]. В зависимости от плотности бактериальной популяции данные процессы регулируются сигнальными системами чувства кворума. Одна из таких систем представлена Rap-фосфатазами и Phr-феромонами [2].

На основании анализа полной нуклеотидной последовательности плазмиды pBS72 размером 102 254 п.н. (GeneBank NCBI, KX711616) были выявлены детерминанты, определяющие синтез белков Rap-Phr (*orf130-orf131*). Молекулярно-генетический и функциональный анализ данных детерминант показал, что подобно филогенетически родственным белкам RapP (идентичность составила 68.4 %) и RapI (идентичность составила 36.9 %), кодируемым соответственно плазмидой pBS32 и конъюгативным транспозоном ICEBs1, исследуемая Rap-фосфатаза негативно влияла на процесс споруляции [1, 3]. Наличие в бактериях *B. subtilis* исходной плазмиды pBS72 снижало эффективность споробразования в 4 раза. В то же время присутствие в клетках плазмидного репликона с инактивированными генами *rap-phr* приводило к увеличению эффективности споруляции в 2 раза.

Установлено, что при конъюгационном переносе плазмиды pBS72 с инактивированными генами *rap-phr* в изогенной системе скрещивания количество клеток донора снижалось в 10 раз через 3 и 4 часа скрещивания и в 100 раз через 24 часа. Количество трансконъюгантов при этом оставалось неизменным (см. таблицу). В то же время культивирование донорных бактерий, содержащих исходную или мутантную плазмиды, в аналогичных условиях в отсутствие штамма реципиента не влияло на их жизнеспособность и стабильность наследования внехромосомных генетических элементов (количество жизнеспособных клеток не изменялось и плазмиды наследовались с частотой 100 %). Следовательно, при скрещивании бактерий *B. subtilis* 168 наличие в клетках донора плазмиды pBS72 с нарушенной системой Rap-Phr приводило к их гибели, которая достоверно увеличивалась через 24 часа.

Полученные результаты являются основой для изучения механизмов, определяющих влияние плазмиды pBS72 на жизнеспособность содержащих ее бактерий, обеспечивающих распространение данного внехромосомного генетического элемента среди микроорганизмов природных популяций.

* Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ №Б21-142.

© А. С. Гуринович, М. А. Титок, 2023

**Количество жизнеспособных клеток донора и реципиента
при переносе исходной и мутантной плазмиды pBS72 между бактериями *B. subtilis* 168**

Время, ч	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
	Исходная плаزمида pBS72		Мутантная плазмида pBS72	
	донор	реципиент	донор	реципиент
1	$(3,1 \pm 0,01) \times 10^6$	$(3,5 \pm 2,1) \times 10^8$	$(6,1 \pm 5,34) \times 10^5$	$(3,8 \pm 1,0) \times 10^8$
2	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^6$	$(4,8 \pm 3,3) \times 10^8$	$(5,4 \pm 4,7) \times 10^6$	$(4,9 \pm 0,5) \times 10^8$
3	$^*(1,5 \pm 0,6) \times 10^7$	$(3,3 \pm 2,1) \times 10^8$	$^*(1,2 \pm 0,27) \times 10^6$	$(5,8 \pm 3,6) \times 10^8$
4	$^*(6,8 \pm 0,3) \times 10^6$	$(6,2 \pm 3,9) \times 10^8$	$^*(4,1 \pm 3,3) \times 10^5$	$(2,1 \pm 1,8) \times 10^9$
24	$^*(2,0 \pm 1,4) \times 10^6$	$(4,3 \pm 4,4) \times 10^8$	$^*(1,6 \pm 1,4) \times 10^4$	$(6,6 \pm 5,9) \times 10^8$

Примечание. «*» — различия между жизнеспособностью клеток доноров, содержащих исходную и мутантную плазмиду, через 3, 4 и 24 часа статистически достоверны ($p \leq 0,05$). Представленные результаты получены на основании трех независимых экспериментов.

Литература

1. Neiditch M. B., Capodagli G. C., Prehna G. et al. Genetic and structural analyses of RRNPP intercellular peptide signaling of gram-positive bacteria // Annual review of genetics. 2017. Vol. 51. P. 311–333.
2. Gallegos-Monterrosa R., Christensen M. N., Barchewitz T. et al. Impact of Rap-Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis* // Communications biology. 2021. Vol. 4. P. 468.
3. Omer Bendori S., Pollak S., Hizi D., et al. The RapP-PhrP quorum-sensing system of *Bacillus subtilis* strain NCIB3610 affects biofilm formation through multiple targets, due to an atypical signal-insensitive allele of RapP // Journal of bacteriology. 2015. Vol. 197, № 3. P. 592–602.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-311

**ПЕПТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ ИНГИБИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНУЮ РНКАЗУ Р
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ: СИНТЕЗ И СВОЙСТВА *****PEPTIDE CONJUGATES OF RNASE P INHIBITING OLIGONUCLEOTIDES:
SYNTHESIS AND PROPERTIES**Н. А. Данилин^{1,2}, А. Л. Матвеев¹, А. В. Бардашева¹, В. М. Гольшев¹, Д. С. Новопашина^{1,2}¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
²*Новосибирский государственный университет*N. A. Danilin^{1,2}, A. L. Matveev¹, A. V. Bardasheva¹, V. M. Golyshev¹, D. S. Novopashina^{1,2}¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
²*Novosibirsk State University*

✉ n.danilin@g.nsu.ru

Аннотация

С использованием оптимизированных подходов получены пептидные конъюгаты олигонуклеотидов, ингибирующих бактериальную РНКазу Р. Исследовано влияние пептидов на стабильность комплексов ингибирующих олигонуклеотидов с модельной РНК-мишенью, на ингибирование РНКазы Р полученными конъюгатами, на эффективность их проникновения в бактерии *A.baumannii* и *E.coli* и антибактериальную активность.

Abstract

Peptide conjugates of inhibiting bacterial RNase P oligonucleotides were obtained using optimized approaches. The influence of peptides on inhibiting oligonucleotide – RNA-target complex stability, inhibition of RNase P by synthesized conjugates, efficacy of penetration in bacterium *A.baumannii* and *E.coli* and their antibacterial activity was investigated.

В связи с развитием у бактерий лекарственной устойчивости и наличием у лекарств побочных эффектов в настоящее время ведется активный поиск и разработка принципиально новых антибактериальных препаратов. РНКазы Р являются важным клеточным ферментом и отвечают за созревание тРНК, поэтому ее инактивация должна приводить к гибели бактерии. В нашей работе мы предлагаем использовать в качестве новых антибактериальных агентов ингибирующие бактериальную РНКазу Р олигонуклеотиды, комплементарные участку РНК-субъединицы фермента, их модифицированные аналоги и пептидные конъюгаты (см. рис.). Поскольку существует проблема, связанная с низким уровнем проникновения олигонуклеотидов в бактериальные клетки, в нашей работе были использованы дополнительные молекулы-доставщики — пептиды, способные взаимодействовать с бактериальной клеточной стенкой.

Целью данной работы были оптимизация химического синтеза и выделения ковалентных конъюгатов ингибирующих РНКазу Р олигонуклеотидов с пептидами-доставщиками, исследование влияния пептидной составляющей на их физико-химические и биологические свойства, а также изучение способности таких конъюгатов проникать в клетки бактерий.

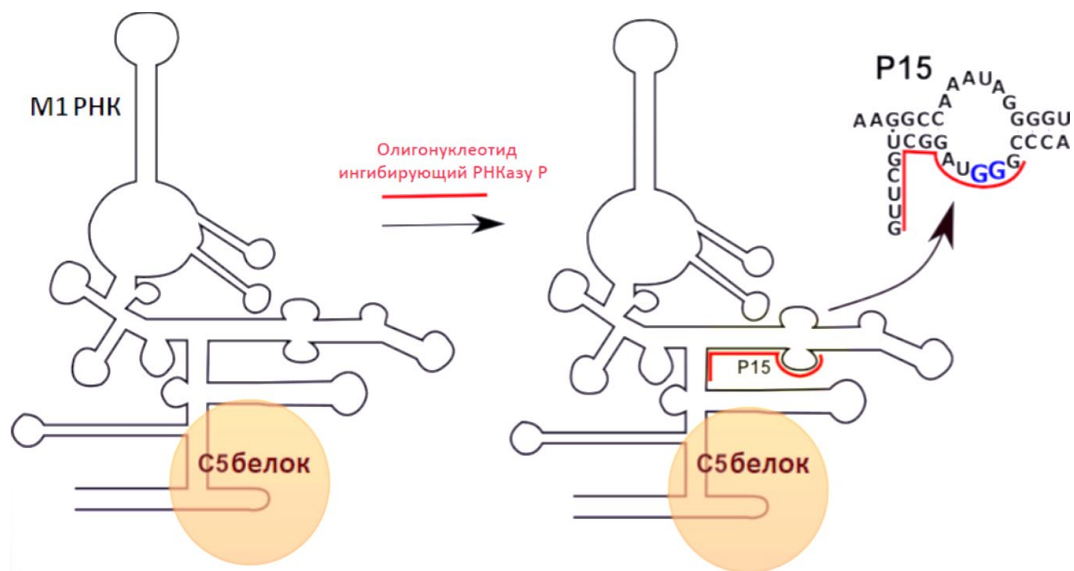
В качестве пептидов использованы положительно заряженные пептиды, выбранные на основе литературных данных, исходя из их биологической активности и способности взаимодействовать с клеточной стенкой бактерий.

На первом этапе проводили синтез необходимых конъюгатов методом тиол-малеимидной конденсации, используя малеимидсодержащий олигонуклеотид (ДНК, РНК или 2'-О-метил-РНК) и SH-содержащий пептид. Были подобраны оптимальные соотношения пептид: олигонуклеотид в реакционной смеси для увеличения выхода реакции, а также условия препаративного выделения пептидных конъюгатов.

Методом термической денатурации и методом задержки в геле было исследовано влияние пептидов на стабильность комплексов ингибирующих олигонуклеотидов с модельной РНК-мишенью, соответствующей участку связывания с РНКазой Р. Показано, что большинство пептидов слабо влияет на стабильность комплекса, в то время как пептид (PepT3) значительно повышает термическую стабильность таких комплексов. Этот эффект, вероятно, вызван его выраженным положительным зарядом. На следующем этапе нашей работы было проведено исследование влияния присоединенного пептида на эффективность ингибирования РНКазы Р путем регистрации

* Работа выполнена в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.
© Н. А. Данилин, А. Л. Матвеев, А. В. Бардашева, В. М. Гольшев, Д. С. Новопашина, 2023

кинетики расщепления флуоресцентно меченого модельного субстрата. Нами было обнаружено, что в большинстве случаев наличие пептида снижает эффективность ингибирования, и при этом зависит от типа олигонуклеотида. Была исследована способность пептидных конъюгатов, а также исходных ингибирующих олигонуклеотидов проникать в клетки бактерий *A. baumannii* и *E. coli*. Наличие пептида в ряде случаев значительно увеличивает эффективность проникновения; кроме того, она зависит от типа олигонуклеотида и типа присоединения пептида (N-концевое или С-концевое) к олигонуклеотиду. Проведено сравнительное исследование антибактериальной активности полученных конъюгатов.



Действие ингибирующих олигонуклеотидов на РНКазу Р.
Район P15 отвечает за каталитическую активность M1 РНК в составе РНКазы Р

Таким образом, созданные нами конъюгаты обладают способностью проникать в бактериальные клетки и ингибировать РНКазу Р и являются потенциальными антибактериальными препаратами.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-312

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БАЗАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ
ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

DERIVATION AND APPLICATION OF AIRWAY BASAL CELLS FROM HUMAN-INDUCED
PLURIPOTENT STEM CELLS FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

А. Г. Демченко¹, Л. Л. Белова¹, М. В. Балясин², Е. В. Кондратьева¹, А. В. Лавров¹, С. А. Смирнихина¹

¹Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва

²Российский университет дружбы народов, Москва

A. G. Demchenko¹, L. L. Belova¹, M. V. Balyasin², E. V. Kondrateva¹, A. V. Lavrov¹, S. A. Smirnikhina¹

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

✉ demchenkoann@yandex.ru

Аннотация

Базальные клетки дыхательных путей являются тканеспецифичными прогениторными эпителиальными клетками, способными к самообновлению и дифференцировке в специализированные клетки легкого. Нами отработан протокол получения базальных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с муковисцидозом и клеток здорового донора. Подобраны условия проведения невирусной и вирусной доставки трансгенов в базальные клетки, а также проведена дифференцировка базальных клеток в легочные органоиды, с последующей функциональной оценкой проводимости CFTR-канала.

Abstract

Airway basal cells are tissue-specific progenitor epithelial cells capable of self-renewal and differentiation into specialized lung cells. We have developed a protocol for obtaining basal cells from induced-pluripotent stem cells from patients with cystic fibrosis and a healthy donor. The conditions for non-viral and viral delivery of transgenes to basal cells were selected. Also functional assessment of the CFTR channel conductance in lung organoids derived from basal cells was carried out.

Базальные клетки (БК) дыхательных путей, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ЧИПСК), являются перспективной клеточной моделью для редактирования мутаций, вызывающих наследственные заболевания, и моделирования заболеваний дыхательных путей. Целью исследования было получить и охарактеризовать линии базальных клеток легкого из ЧИПСК здорового донора и доноров с муковисцидозом с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR*, а также оптимизировать вирусную и невирусную доставку трансгенов в клетки.

Дифференцировку ЧИПСК в БК проводили по опубликованному протоколу с модификацией некоторых этапов [1]. Характеризацию БК на экспрессию маркеров базальных клеток (TP63, СК5) проводили методами иммуноцитохимического окрашивания и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Получение легочных органоидов (ЛО) из БК осуществляли методом трехмерного культивирования в Matrigel. Функциональную активность CFTR-канала в ЛО оценивали с помощью форсколин-индуцированного набухания [2]. Трансфекцию плазмиды с *GFP* в базальные клетки проводили методом электропорации (Neon). Трансдукцию плазмид в БК проводили рекомбинантными аденоассоциированными вирусами (рААВ) 6-го и 9-го серотипов, содержащими репортерный ген *GFP*, и рекомбинантным аденовирусом (рАВ) 5-го серотипа, содержащим репортерный ген *mCherry*. Эффективность трансфекции и трансдукции рААВ оценивали методом проточной цитофлуориметрии по флуоресцентному свечению GFP, а рАВ5 — по флуоресцентному свечению mCherry.

Получены культуры БК здорового донора и доноров с гомозиготной мутацией F508del в гене *CFTR* путем клеточной сортировки NKX2.1+ легочных прогениторов, дифференцированных из ЧИПСК, по поверхностному маркеру базальных клеток CD271. Качественный анализ экспрессии генов подтвердил, что полученные культуры клеток экспрессируют маркеры базальных клеток, а образованные из БК легочные органоиды экспрессируют маркеры клеток легкого. По результатам форсколин-индуцированного набухания, легочные органоиды, полученные из БКЛ здорового донора, набухали через 24 ч в среднем в $1,834 \pm 0,739$ раз ($p < 0,0001$), в то время как ЛО

из БКЛ пациентов с гомозиготной мутацией F508del не набухали в ответ на форсколин ($p > 0,05$), относительно временной точки 0 ч. Эффективность трансфекции плазмиды с *GFP* в БК составила $25,1 \pm 8,5$ %. Эффективность трансдукции рААВ6 и рААВ9 составила $86,4 \pm 1,4$ % и $33,4 \pm 2,1$ % соответственно. Эффективность трансдукции рАВ5 составила $89,7 \pm 1,2$ %.

Результаты работы демонстрируют возможность получения мультипотентных базальных клеток дыхательных путей, которые стабильно пересеиваются, долго поддерживаются в культуре и имеют эффективность трансфекции выше в сравнении с чИПСК ($2,8 \pm 0,8$ %), что делает их перспективным объектом для редактирования мутации F508del в гене *CFTR* для разработки генной терапии муковисцидоза. Также полученные БК способны образовывать легочные органоиды, что дает возможность проведения форсколин-индуцированного набухания для оценки проводимости канала CFTR.

Литература

1. Hawkins F. J., Suzuki S., Beermann M. L. et al. Derivation of airway basal stem cells from human pluripotent stem cells // Cell Stem Cell. 2021. Vol. 28, №. 1. P. 79–95.
2. Demchenko A., Kondrateva E., Tabakov V. et al. Airway and Lung Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Used to Assess CFTR Conductance // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, №. 7. P. 6293.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-313

**ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ И ТРИТОНА X-100
НА АКТИВНОСТЬ Na,K-АТФАЗЫ СМЕШАННОЙ МЕМБРАННОЙ ФРАКЦИИ
КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

**EFFECT OF SODIUM DEOXYCHOLATE AND TRITON X-100
ON THE ACTIVITY OF Na,K-ATPASE OF THE MIXED MEMBRANE FRACTION
OF THE CEREBRAL CORTEX OF RATS**

Е. В. Дерягина, К. А. Макарова

Институт биологии, Тюмень

E. V. Deryagina, K.A. Makarova

Institute of Biology, Tyumen✉ teterin6969@gmail.com**Аннотация**

Na⁺/K⁺-АТФаза — белок с ассиметричной организацией, поддерживающий мембранный потенциал. Активные центры находятся внутриклеточно, выявление активности без увеличения проницаемости мембраны не представляется возможным.

Цель исследования — изучить активности убаин-чувствительных и убаин-резистентной изоформ в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс при воздействии детергентов Тритон X-100 и Dox-Na.

Abstract

Na⁺/K⁺-ATPase is an asymmetrically organized protein that maintains membrane potential. The active centers are intracellular; detection of activity without an increase in membrane permeability is not possible.

The aim of the study was to study the activity of ouabain-sensitive and ouabain-resistant isoforms in the mixed membrane fraction of the cerebral cortex of rats exposed to the detergents Triton X-100 and Dox-Na.

Активность АТФаз определяли по приросту неорганического фосфата как разницу между общей АТФазной активностью и активностью Mg-АТФазы. Данная методика позволяет выборочно заингибировать только убаин-чувствительные изоформы и изучить активность убаин-резистентной изоформы [1]. Прирост неорганического фосфата определялся по методу Чена [2]. Белок в ферментных препаратах определяли по методу Лоури [3].

Анализ полученных результатов, представленных в виде графиков, показал, что в отсутствии детергентов активность как убаин-чувствительных, так и убаин-резистентных изоформ Na⁺/K⁺-АТФазы выявляется слабо, однако с ростом концентрации детергентов наблюдается увеличение активности фермента. Кривые зависимости имеют двухфазный характер, в котором фаза быстрого роста в небольшом диапазоне концентрации детергентов сменяется фазой выраженного снижения. Максимальная активность исследуемых изоформ наблюдалась при концентрациях детергентов: 1,25 мг/мл и 0,5 мг/мл в случае с Dox-Na и Тритон X-100 соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации обоих детергентов приводило к снижению активности фермента, что связано с разрушением белок-липидных связей.

Ферментный препарат обработанный Dox-Na имеет характерную форму кривых, значения активности Na⁺/K⁺-АТФазы выходят на плато в более широком диапазоне концентраций детергента. Связано это со сходной структурой данного детергента с холестерином, так как Dox-Na является производным желчных кислот [4]. Данная архитектура молекулы позволяет детергенту взаимодействовать с центром связывания холестерина на белке, тем самым вытесняя липид и оказывая воздействия на фермент.

Проводились исследования активности Na⁺/K⁺-АТФазы от концентраций ионов магния в инкубационной среде, при этом использовались концентрации детергентов выявляющие пиковые значения активности фермента. Полученные данные указывают на сохранение конформационной лабильности фермента в ходе реакционного цикла.

Выявление активности Na⁺/K⁺-АТФазы сопряжено с определением активности Mg²⁺-АТФазы. Полученные данные аналогичны результатам, полученным при исследовании активности изоформ Na⁺/K⁺-АТФазы.

Литература

1. Казеннов А. М., Маслова М. Н. Особенности активации детергентами Na,K-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1980. Т. 16, № 5. С. 430.
2. Chen, P.S., Toribara, J.T.Y., Warner, H. Microdetermination of phosphorus // Analytical Chemistry. 1956. Vol. 28. P. 1756
URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60119a033>
3. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // The J. of biological chemistry. 1951. Vol. 193, №1. P. 265. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>
4. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: пер. с англ. М.: Мир, 1997. С. 624.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-314

**ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА АМПЛИФИКАЦИЙ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ
НА УРОВЕНЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
И ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***

**EFFECT OF THE NUMBER OF STEMNESS GENE AMPLIFICATIONS
ON THEIR EXPRESSION LEVEL AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF CELL LINES
AND TUMORS OF BREAST CANCER PATIENTS**

Д. С. Долгашева¹, Е. А. Кравцова¹, И. А. Цыденова¹, К. А. Гаптулбарова¹,
К. В. Невская², А. Г. Першина², Н. В. Литвяков¹

¹ Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
² Сибирский государственный медицинский университет, Томск

D. S. Dolgasheva¹, E. A. Kravtsova¹, I. A. Tsydenova¹, K. A. Gaptulbarova¹,
K. V. Nevskaya², A. G. Pershina², N. V. Litvyakov¹

¹Tomsk Cancer Research Institute
²Siberian State Medical University, Tomsk

✉ normikus.18.97@gmail.com

Аннотация

Метастатическая болезнь является основной причиной смерти онкологических больных, в связи с этим актуально исследование различных механизмов метастазирования. Цель данной работы — изучить влияние количества амплификаций генов стволовости на субпопуляционный состав опухолевых клеточных линий, а также установить зависимость уровня экспрессии генов стволовости от количества амплификаций в клеточных линиях и опухоли больных раком молочной железы.

Abstract

Metastatic disease is the main cause of death in cancer patients; therefore, it is relevant to study various mechanisms of metastasis. The aim of this work is to study the influence of the number of stemness gene amplifications on the subpopulation composition of tumor cell lines, as well as to establish the dependence of the level of stemness gene expression on the number of amplifications in cell lines and tumors of breast cancer patients.

Материалы и методы

В исследование было включено 39 больных раком молочной железы и клеточные линии рака молочной железы: BT549, MDA-MB-231, MCF7, T47D и BT474. Оценка экспрессии генов стволовости в опухоли до лечения и в клеточных линиях проводилась на микрочипах CytoScan™ HD Array и Clariom™ S Assay, амплификации генов стволовости изучали при помощи микроматриц CytoScan HD Array. Субпопуляционный состав исследуемых линий изучали методом проточной цитометрии с антителами к CD44 и CD24.

Результаты

У пациентов в опухоли до лечения, согласно F-test, статистически значимо, в зависимости от количества амплификаций генов стволовости изменялась экспрессия 18 генов стволовости (рис. 1, A).

Корреляционный анализ уровня экспрессии генов стволовости с количеством амплификаций в опухоли показал статистически значимую положительную корреляцию с числом амплификаций для 9 генов (*FZD9*, *CDK6*, *PIM1*, *SOX8*, *TERT*, *CCNF*, *KLF5*, *TGFBR1*, *SOX4*) с R от 0.31–0.66, на уровне тенденции ($p < 0.1$) еще для *NOTCH1* и *TGFBI* (рис. 1B). Минимальное значение коэффициента корреляции отмечается для гена *POU5F1* = 0.17. Для клеточных линий также отмечается повышение уровня экспрессии генов стволовости с увеличением числа амплифицированных генов. Наибольшее количество амплифицированных генов стволовости — 15 было обнаружено в линиях BT474 и MDA-MD-468, и в этих же линиях отмечалась наибольшая экспрессия генов стволовости (рис. 1, C). ПЦР-анализ подтвердил данные по повышению экспрессии при сравнении линий T47D (11 амплифицированных генов) и BT474 (15 амплифицированных генов) (рис. 1, D).

* Работа выполнена при поддержке гранта Минобр. РФ 075-15-2021-1073.

© Д. С. Долгашева, Е. А. Кравцова, И. А. Цыденова, К. А. Гаптулбарова, К. В. Невская, А. Г. Першина, Н. В. Литвяков, 2023

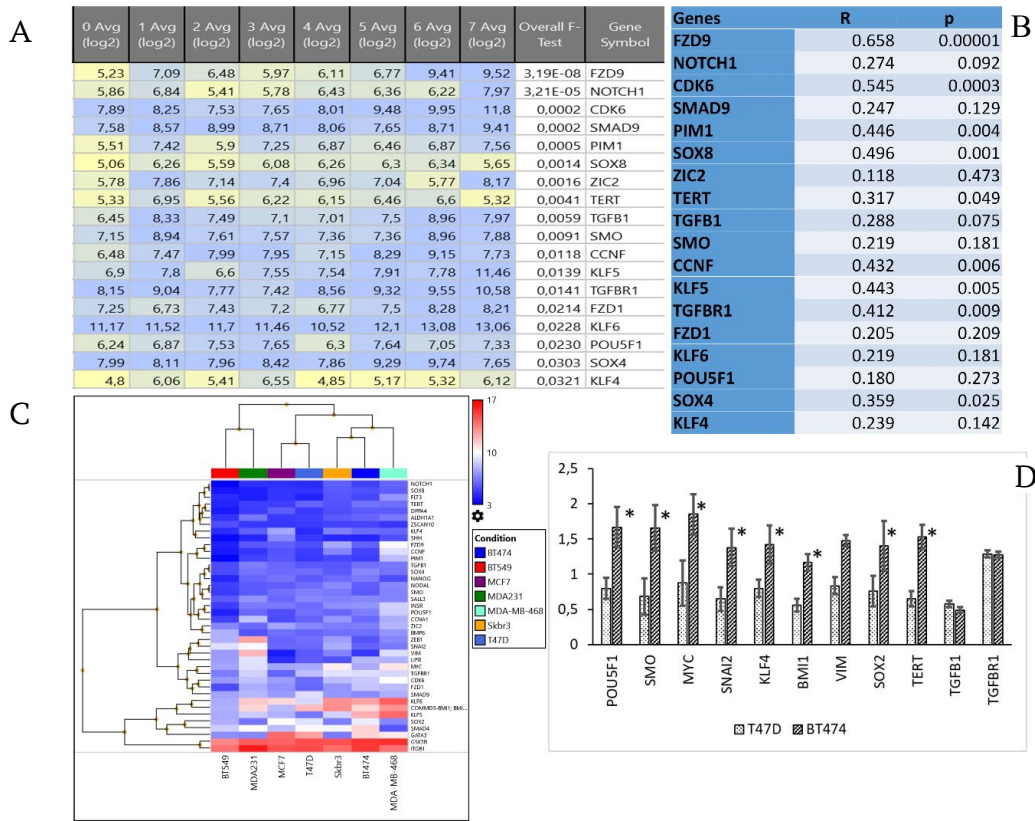


Рис. 1. Зависимость экспрессии генов стволовости от количества амплификаций их локусов: А — данные по экспрессии генов стволовости у 39 больных с количеством 0–7 амплификаций в опухоли молочной железы до лечения; В — коэффициент корреляции уровня экспрессии и количества амплификаций генов стволовости по Спирмену; С — тепловая карта экспрессии генов стволовости в клеточных линиях рака молочной железы; D — различия по уровню экспрессии генов стволовости в линиях T47D и BT474

При изучении субпопуляционного состава клеточных линий отмечается, что с увеличением количества амплификаций генов стволовости увеличивается частота более дифференцированных субпопуляций и степень их дифференцировки в ряду от опухолевых стволовых CD44+CD24- клеток к дифференцированным CD44-CD24- (рис. 2, А, В).

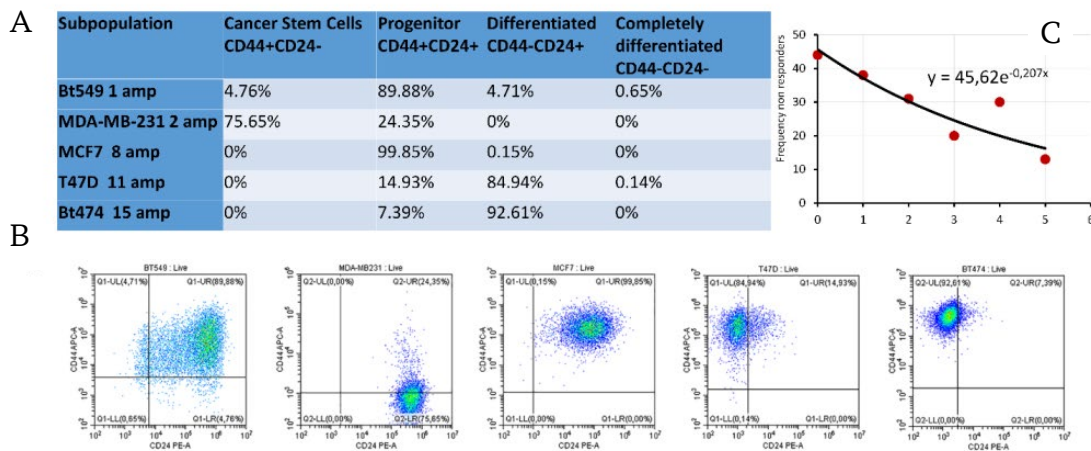


Рис. 2. Ассоциация субпопуляционного состава клеточных линий и частоты плохого ответа на неoadъювантную химиотерапию с количеством амплификаций генов стволовости: А — субпопуляционный состав клеточных линий в зависимости от количества амплификаций генов стволовости; В — данные проточной цитометрии по субпопуляционному составу клеточных линий; С — частота плохого ответа на неoadъювантную химиотерапию у больных раком молочной железы в зависимости от количества амплификаций генов стволовости в опухоли до лечения; по оси абсцисс — количество амплификаций хромосомных регионов локализации генов стволовости

Мы полагаем, что при большом количестве амплификаций, клетки легко дедифференцируются с образованием опухолевых стволовых клеток. На рис. 2С представлена зависимость частоты ответа на неоадьювантную химиотерапию у больных в зависимости от количества амплификаций локусов генов стволовости в опухоли до лечения. Видна обратная экспоненциальная зависимость $y = 45,62e^{-0,207x}$ от количества амплификаций. Таким образом, чем больше количество амплификаций, тем меньше частота больных, которые не ответили на неоадьювантную химиотерапию.

Выводы

Было установлено, что количество амплификаций генов стволовости оказывает влияние на субпопуляционный состав клеточных линий и экспрессию генов стволовости как в клеточных линиях, так и в опухоли больных раком молочной железы.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-315

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ НЕВЕСОМОСТИ
И МАГНИТНОЙ ЛЕВИТАЦИИ НА ПРОТЕОМ *ESCHERICHIA COLI***

**A COMPARATIVE STUDY OF THE IMPACT OF MICROGRAVITY AND MAGNETIC LEVITATION
ON *ESCHERICHIA COLI* PROTEOME**

П. А. Домнин¹, А. С. Кононихин², В. А. Парфенов³, С. А. Ермолаева¹, Ю. Д. Хесуани³

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

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

³Лаборатория биотехнологических исследований 3D Bioprinting Solutions, Москва

P.A. Domnin¹, A. S. Kononikhin², V.A. Parfenov³, S.A. Ermolaeva¹, Yu. D. Khesuani³

¹Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow

²Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

³3D Bioprinting Solutions, Laboratory for Biotechnological Research, Moscow

✉ paveldomnin6@gmail.com

Аннотация

Изучена возможность использования феномена магнитной левитации в магнитном биопринтере как модели невесомости на примере культуры *E.coli*. Проведен сравнительный анализ протеомов культур, выращенных в стандартных условиях, магнитном биопринтере, а также в невесомости в рамках эксперимента на МКС в магнитном биопринтере и без него.

Abstract

Here we investigated whether it is possible to use magnetic levitation as a model of microgravity. The proteome of *E. coli* grown under spaceflight or combined spaceflight and magnetic force conditions were compared with ground cultivated bacteria grown under standard (control) or magnetic levitation conditions.

Космическая микробиология изучает как прикладные вопросы, например, разработку методов лечения и профилактики инфекций у космонавтов и коррозию оборудования космических станций из-за микробной активности, так и более фундаментальные задачи, например, изменения в морфологии и физиологии микроорганизмов. В связи с техническими и экономическими трудностями микробиологических экспериментов в космосе необходима разработка моделей, позволяющих воспроизводить условия невесомости максимально достоверно.

В нашем исследовании опробован магнитный биопринтер — система, моделирующая условия космического полета за счет феномена магнитной левитации и разработанная 3d bioprinting solutions, Ltd [1]. В условиях магнитной левитации сила гравитации, действующая на объект, уравновешивается магнитной силой, направленной в противоположном направлении, т.е. вверх. В состоянии магнитной левитации могут находиться только диамагнитные объекты, в том числе биологические объекты. Магнитный биопринтер представляет собой пару постоянных неодимовых магнитов, приложенных вплотную друг к другу южными полюсами и зафиксированных с помощью металлического каркаса. В центре каждого из магнитов есть канал для размещения емкости со средой. За счет конфигурации магнитов внутри объема среды, помещенной в устройство, формируется воронкообразный градиент магнитного поля. В точке минимального градиента магнитного поля — магнитной ловушке — происходит скопление диамагнитных объектов.

В 2019 г. в рамках серии экспериментов с магнитными биопринтерами на МКС было изучено комбинированное влияние магнитной левитации и невесомости на культуру *Escherichia coli* штамм M17, а также каждого из этих факторов по отдельности [2]. Изменения в культуре изучали с помощью протеомного анализа на базе ИБХФ РАН с использованием базы данных KEGG. Оценивалась разница экспрессии белков в следующих парах образцов: 1) невесомость / контроль на Земле, 2) биопринтер в невесомости / контроль на Земле, 3) биопринтер на Земле / контроль на Земле, 4) невесомость / биопринтер на Земле.

Основные изменения были обнаружены в следующих функциональных классах белков: 1) белки, участвующие в реализации генетической информации (рибосомальные белки RS1 и RS6, фактор терминации транс-

крипции Rho, β -субъединицы РНК-полимеразы RpoB, полинуклеотидфосфорилаза Pnp); 2) стрессорные белки (гидропероксидаза KatG, НАД(Ф)Н дегидрогеназа (хинон) WrbA, субъединица С алкилгидропероксидредуктазы AhpC, шапероны DnaK и ClpB, АТФ-зависимая протеаза Clp); 3) белки, участвующие в метаболизме углеводов (изоцитратлиаза AceA, изоцитратдегидрогеназа Idh, пируватформатлиазы TdcL и PflB, метилглиоксальсинтетазы MgsA, глиоксилаза ElbB, ацетаткиназа AckA, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа GlpA, транскетолаза Tkt1, 4) поверхностные белки (мембранный транспортер кобаламина BtuB, адгезин Ag43, структурный белок жгутика FliC) (см. таблицу).

Результаты протеомного анализа

Функциональный класс белков	Название белка	Log2 соотношения экспрессии			
		Невесомость / контроль на Земле	Невесомость + биопринтер / контроль на Земле	Биопринтер на Земле / контроль на Земле	Космос / биопринтер на Земле
Белки, участвующие в реализации генетической информации	RS1	0,1	-	0,8	-0,8
	RS6	0,7	1,2	-0,4	1,2
	Pnp	0,7	2,4	-0,5	1,2
	RpoB	-1,4	-2,6	-0,3	-1,1
	Rho	0,9	1,0	-0,1	1,0
Стрессорные белки	KatG	1,0	1,8	0,25	0,8
	WrbA	1,5	2,0	1,0	0,5
	AhpC	0,2	1,1	-0,9	1,1
	DnaK	-1,6	-3,5	0,3	-1,9
	ClpB	-1,0	-3,1	1,1	-2,1
	ClpXP	-0,9	-	2,6	-3,7
Белки, участвующие в метаболизме углеводов	AceA	2,1	3,3	1,3	-1,2
	Idh	-1,1	-4,1	1,9	-3,0
	TdcE	-1,8	-3,8	0,2	-2,0
	PflB	-1,6	-2,5	0,1	-1,6
	MgsA	0,7	2,5	-1,0	1,8
	ElbB	1,3	-	0,1	1,3
	AckA	-0,8	-	-1,2	0,5
	GlpA	0,2	1,6	-1,3	-1,4
	Tkt1	0,1	1,6	-1,3	1,4
Поверхностные белки	BtuB	4,0	6,2	1,8	2,1
	Ag43	1,4	1,3	1,3	0,1
	FliC	0,1	-	3,8	-3,8

Литература

1. Parfenov V.A., Mironov V.A., Van Kampen K.A. et al. Scaffold-free and label-free biofabrication technology using levitational assembly in a high magnetic field // Biofabrication. 2020. Vol. 12. P. 45022.
2. Domnin P.A., Parfenov V.A., Kononikhin A.S. et al. Combined Impact of Magnetic Force and Spaceflight Conditions on Escherichia coli Physiology // International J. of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23(3). P. 1837.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-316

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДОСТАВКИ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ HIF1-А
В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-87 MG ***

В. О. Дорошенко, Н. В. Гончаров

Институт наук о жизни и биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

V. O. Doroshenko, N. V. Goncharov

Institute of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok

✉ doroshenko.vo@students.dvfu.ru

Аннотация

Нами была разработана и сконструирована рекомбинантная конструкция, которая содержит домен ODD, связанный с флуоресцентным репортером mCherry. Соединения способные ингибировать HIF-1, PHD, VHL или прочие молекулярные детерминанты гипоксического ответа опухолей будут приводить к потере или увеличению флуоресцентного сигнала в клетках. Кандидаты, обнаруженные с помощью данного метода, могут быть рассмотрены как возможные противоопухолевые препараты.

Abstract

We have developed and constructed a recombinant construction that contains the ODD domain associated with the fluorescent reporter mCherry. Compounds capable of inhibiting HIF-1, PHD, VHL or other molecular determinants of the hypoxic response of tumors will lead to a loss or increase in the fluorescent signal in cells. Candidates detected using this method can be considered as possible antitumor drugs.

Гипоксия характерна для большинства глиом и сопровождается активацией транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией HIF1, состоящего из α - и β -субъединиц: в нормоксии обе субъединицы экспрессируются, однако HIF1- α утилизируется путем протеасомной деградации и не образует функционального транскрипционного фактора с β -субъединицей. Фермент пролилгидроксилаза (PHD) гидроксилирует остатки пролина HIF1- α в положениях P564 и P402, которые являются частью домена ODD и обеспечивают связывание HIF1- α с белковым комплексом von Hippel-Lindau, который убиквитинирует HIF1- α , приводя к ее протеасомной деградации [1]. При гипоксии деградация блокируется, HIF1- α связывается с HIF1- β для активации каскадов, которые обеспечивают селективные преимущества клеткам опухолей [2].

Клеткам глиом характерна мутация в гене изоцитратдегидрогеназы IDH^{R132H}, которая обуславливает продукцию D-2-гидроксиглутарата (2-HG) вместо α -кетоглутарата. 2-HG ингибирует активность PHD, приводя к блокировке деградации HIF1- α , а сигнальный путь p53 ингибируется, возникает геномная нестабильность, которая усиливает онкогенез [3].

Одной из стратегий терапии глиом является поиск регуляторов HIF1- α , поэтому перспективным направлением является разработка клеточных моделей, позволяющих проводить скрининг соединений, ингибирующих HIF1. Таким образом, целью данной работы является разработка системы доставки кодирующей последовательности домена деградации HIF1 – ODD, связанного с флуоресцентным репортером в клетки человека.

В ходе работы получена химерная молекула ДНК ODD-mCherry, которая была клонирована в вектор pH2B-mCherry-IRES-puro2. Получившейся лигазной смесью трансформировали культуру *E. coli*. Далее провели ПЦР колоний, по результатам которой три колонии оказались положительными, то есть имели вставку ODD-mCherry. Так был сконструирован и получен вектор pLV-IRES-ODD-mCherry.

Разработанный вектор был апробирован в клетках НЕК-293Т посредством трансфекции клеток полученной плазмидой с использованием полиэтиленimina (PEI). Экспрессию анализировали с помощью микроскопии: флуоресцентный сигнал обнаружен спустя сутки после трансфекции, что указывает на то, что вектор был успешно экспрессирован.

При помощи упаковочных плазмид в клетках НЕК-293Т были получены лентивирусные частицы, которые подвергались концентрированию в градиенте сахарозы, после чего осуществлялась трансдукция клеточной линии U-87 MG для апробации лентивируса. В качестве альтернативных методов, позволяющих невирусным способом перенести созданную конструкцию в клетки линии U-86 MG, мы апробировали оптимизированные

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-00100.

© В. О. Дорошенко, Н. В. Гончаров, 2023

протоколы нуклеофекции и трансфекции полиэтиленимином. Первый метод показал малую эффективность из-за низкой выживаемости клеток, трансфекция же продемонстрировала наибольшую эффективность. При анализе экспрессии GFP в клетках, подвергавшихся трансфекции совместно с плазмидой pcDNA3, было определено количество клеток, излучающих флуоресцентный сигнал, относительно общего их числа и выявлена средняя эффективность трансфекции, которая составила 15,85 %.

Литература

1. Hon W. C., Wilson M. I., Harlos K., Claridge T.D et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by VHL (англ.) // Nature. 2002. Vol. 417, № 6892. P. 975–978. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12050673/>
2. Huang L. E., Arany Z., Livingston D. M., Bunn H. F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit (англ.) // J. of Biological Chemistry. 1996. Vol. 271, № 50. P. 32253–32259. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8943284/>
3. Xu W., Yang H., Liu Y et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases (англ.) // Cancer Cell. 2011. Vol. 19, № 1. P. 17–30. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251613/>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-317

**МИКРОРНК ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЫВОРОТКИ КРОВИ
КАК МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА ПРИ ОЖИРЕНИИ*****MICRORNA OF SERUM EXTRACELLULAR VESICLES AS MARKERS
OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS DEVELOPMENT IN OBESITY**К. В. Драчева^{1,2}, И. А. Побожева^{1,2}, К. А. Анисимова², З. М. Хамид²,
С. Г. Баландов², Д. И. Василевский², С. Н. Пчелина^{1,2}, В. В. Мирошникова^{1,2}¹*Петербургский институт ядерной физики**им. Б. П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина*²*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ*K. V. Dracheva^{1,2}, I. A. Pobozeva^{1,2}, K. A. Anisimova², Z. M. Hamid²,
S. G. Balandov², D. I. Vasilevsky², S. N. Pchelina^{1,2}, V. V. Miroshnikova^{1,2}¹*Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov
of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Gatchina*²*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*

✉ dracheva_kv@pnpi.nrcki.ru

Аннотация

Исследование предполагало проведение профилирования микроРНК экстраклеточных везикул (ЭВ), секретируемых жировой тканью (ЖТ), у пациентов с ожирением и в группе сравнения, с последующим анализом содержания микроРНК, продемонстрировавших различия в ЭВ ЖТ, в ЭВ сыворотки крови у пациентов с ожирением с/без СД2 и в группе сравнения. Показано, что экзосомальные микроРНК hsa-miR-551b-3p и hsa-miR-302d-3p, могут быть маркерами развития СД2 при ожирении.

Abstract

The study involved microRNA profiling of extracellular vesicles (EV) secreted by adipose tissue in obese patients and in a control group, followed by content analysis of microRNAs demonstrating differences in adipose tissue EV, in serum EV in obese patients with/without T2DM and in the control group. We found 2 microRNAs: hsa-miR-551b-3p and hsa-miR-302d-3p, which may be markers of T2DM development in obesity.

Экстраклеточные везикулы (экзосомы, ЭВ) — это внеклеточные пузырьки, выделяемые в межклеточное пространство клетками различных тканей и органов, и осуществляющие межклеточную коммуникацию за счет транспорта белков, сахаров, липидов, мРНК, а также микроРНК. В свою очередь, микроРНК могут влиять на экспрессию генов в клетках-реципиентах путем ингибирования трансляции и ускорения деградации мРНК [1].

Жировая ткань (ЖТ) является основным источником экзосомальных микроРНК плазмы крови [2]. Ожирение ассоциировано с дисфункцией ЖТ и может сопровождаться изменениями состава микроРНК экзосом. Предполагается, что микроРНК ЭВ можно использовать в качестве биомаркеров развития сопутствующих ожирению патологий, в том числе сахарного диабета 2 типа (СД2).

Цель: поиск микроРНК, секретируемых ЖТ в составе ЭВ, которые могут выступать в качестве маркеров развития СД2 при ожирении.

Материалы и методы

Первый этап исследования предполагал профилирование микроРНК ЭВ, секретируемых ЖТ при культивировании *ex vivo*, у пациентов с ожирением и в группе сравнения. На втором этапе исследовалось содержание микроРНК, продемонстрировавших различия по составу в ЭВ ЖТ при ожирении, в ЭВ сыворотки крови при ожирении и СД2. ЭВ культуральной среды/сыворотки крови выделяли с помощью реагента Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific). Для выделения РНК использовали: реагент Qiazol (Qiagen) и набор RNA Clean & Concentrator (Zymo Research).

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-25-00207.

Этап I. Были использованы парные образцы подкожной и висцеральной ЖТ (ПЖТ и ВЖТ) 4 пациентов с ожирением без СД2 (1/3 мужчина/женщины, ИМТ > 35), полученные при проведении бариатрических операций, и ВЖТ 4 лиц без ожирения (1/3 мужчина/женщины, ИМТ < 30), составляющих группу сравнения, полученные при плановых операциях на брюшной полости. ЖТ культивировали в течение 12 часов. Мультиплексное профилирование микроРНК было выполнено методом NanoString с использованием панели Human v3 miRNA expression assay kit, на приборе nCounter FLEX. Данные были нормированы на 2 стабильно экспрессирующиеся микроРНК (hsa-378g и hsa-let-7c-5p), которые были установлены с использованием алгоритма NormFinder [3].

Этап II. Исследования содержания микроРНК, продемонстрировавших различия по составу в ЭВ ЖТ при ожирении, было оценено в ЭВ сыворотки крови в следующих группах пациентов: 1) с ожирением без СД2 ($N = 9$, ИМТ > 35); 2) с ожирением и СД2 ($N = 15$, ИМТ > 35), и 3) лиц без ожирения (группа сравнения, $N = 7$, ИМТ < 30). Оценка относительного содержания микроРНК в образцах была проведена методом ПЦР в реальном времени с использованием мастер микса qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Дизайн праймеров для обратной транскрипции и ПЦР был выполнен согласно работе Lan et al [4].

Результаты

Профилирование микроРНК показало снижение содержания следующих микроРНК в ЭВ ВЖТ: hsa-miR-1246, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-551b-3p ($p < 0.05$) у пациентов с ожирением по сравнению с группой лиц без ожирения. Также при сравнении содержания микроРНК в ЭВ в зависимости от типа ЖТ у лиц с ожирением было продемонстрировано снижение содержания hsa-miR-10a-5p в ЭВ ПЖТ по сравнению с ВЖТ ($p < 0.05$). Содержание hsa-miR-132-3p и hsa-miR-302d-3p было выше в ЭВ ПЖТ по сравнению с ВЖТ ($p < 0.05$).

Анализ таргета вышеперечисленных 6 микроРНК показал, что продукты их генов-мишеней задействованы в частности в биологических путях, связанных с развитием СД2: сигнальный путь инсулина (KEGG hsa04910) и резистентность к инсулину (KEGG hsa04931). Сравнительный анализ содержания данных микроРНК в экзосомах сыворотки крови показал снижение содержания hsa-miR-551b-3p у пациентов с ожирением без СД2 по сравнению с пациентами с ожирением с СД2 ($p = 0.030$), и лицами без ожирения ($p = 0.044$). При этом различий между группой пациентов с СД2 и группой сравнения не было выявлено. Наблюдалась положительная корреляция уровня hsa-miR-551b-3p в ЭВ сыворотки крови с уровнем гликированного гемоглобина в общей выборке ($r = 0,491$, $p = 0,028$), которая сохранялась у пациентов с ожирением без СД2 ($r = 0,812$, $p = 0,050$).

Также было показано снижение содержания hsa-miR-302d-3p в ЭВ сыворотки крови у пациентов с ожирением без СД2 по сравнению с пациентами с СД2 ($p = 0.042$), различий между пациентами с СД2 и группой сравнения не выявлено. Выявлена положительная корреляция уровня hsa-miR-302d-3p в ЭВ сыворотки крови с концентрацией триглицеридов плазмы крови у пациентов с ожирением без СД2 ($r = 0,762$, $p = 0,028$).

Таким образом, содержание микроРНК hsa-miR-551b-3p и hsa-miR-302d-3p в экзосомах сыворотки крови повышается у пациентов с СД2 по сравнению с пациентами с ожирением без СД. Данные микроРНК могут быть маркерами развития СД2 при ожирении.

Литература

1. Cottrell K.A., Szczesny P., Djuranovic S. Translation efficiency is a determinant of the magnitude of miRNA-mediated repression // Scientific reports. 2017. Vol. 7, №. 1. P. 1–10.
2. Thomou T. et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues // Nature. 2017. Vol. T. 542, № 7642. P. 450–455.
3. Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // Cancer research. 2004. Vol. 64, №. 15. P. 5245–5250.
4. Lan L. et al. Linear-hairpin variable primer RT-qPCR for MicroRNA // Chemical Science. 2019. Vol. 10, № 7. P. 2034–2043.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-318

АКТИВАЦИЯ БИНАРНЫМИ АНТИСМЫСЛОВЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ ДЕГРАДАЦИИ МРНК-МИШЕНИ С ПОМОЩЬЮ KRAS ТРАНСКРИПТА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562***BINARY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES ACTIVATE DEGRADATION OF THE TARGETED MRNA IN KRAS-DEPENDENT MANNER IN K562 CELL LINE**В. С. Дрозд¹, Д. С. Рыбалко¹, А. А. Салимова¹, Д. М. Колпашиков^{2,3}, А. А. Эльдиб¹¹*Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург*²*Химический факультет, Университет центральной Флориды, Орlando, США*³*Школа биомедицинских наук Бернетта Университета центральной Флориды, Орlando, США*

✉ drozd@scamt-itmo.ru

V. S. Drozd¹, D. S. Rybalko¹, A. A. Salimova¹, D. M. Kolpashchikov^{2,3}, A. A. Eldeeb¹¹*SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*²*Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA*³*Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA***Аннотация**

Показана биомаркер-зависимая деградация мРНК гена-мишени в клеточной линии K562, вызываемая бинарными антисмысловыми олигонуклеотидами (БиАСО). С интеграцией БиАСО в ДНК-систему удалось достигнуть 40%-й деградации мРНК в присутствии биомаркера. Новая технология БиАСО отличается простотой дизайна, а также открывает возможность прямого таргетирования наиболее уязвимых генов домашнего хозяйства в онкотерапии.

Abstract

Biomarker-dependent degradation of target gene mRNA in the K562 cell line induced by binary antisense oligonucleotides (BiASO) was demonstrated. When BiASO was integrated into the DNA system, a 12-fold increase in mRNA degradation in the presence of the biomarker was achieved. The new BiASO technology is characterized by simplicity of design and also opens the possibility of directly targeting the most vulnerable housekeeping genes in cancer therapy.

Благодаря достижениям ДНК-нанотехнологий удалось преобразовать классическую технологию антисмысловых олигонуклеотидов в бинарные антисмысловые олигонуклеотиды (БиАСО). Были протестированы две ДНК-системы на основе БиАСО. Каждая ДНК-система содержит 3 олигонуклеотида, объединенные в общую систему путем отжига в градиенте температур (95 --> 23 °C). Обе ДНК-системы различны по дизайну одного олигонуклеотида — ДНК-каркаса: для первой ДНК-системы (ДС1) характерно наличие «безрукового» ДНК-каркаса, для второй ДНК-системы (ДС2) были разработаны «руки» (сайты), раскручивающие вторичную структуру мРНК гена-мишени. 2 других олигонуклеотида представляют собой БиАСО, которые идентичны в обеих ДНК-системах и каждый олигонуклеотид состоит из 3 функциональных частей, разделенных между собой гексаэтиленгликолевыми линкерами: 1) сайты, связывающие целевую мРНК; 2) сайты, связывающие РНК биомаркера; 3) сайты, образующие стабильную структуру с ДНК-каркасом.

Обе ДНК-системы были химически модифицированы по общему принципу: тиофосфатные модификации для сайтов, связывающих целевую мРНК с целью вызова РНКазы Н-зависимого сайленсинга гена GFP, в свою очередь, 2'-О-Метильные химические модификации использовались для защиты сайтов, связывающих РНК биомаркера KRAS с целью одновременной активации терапевтической функции ДНК-системы и ингибирования РНКазы Н в этом участке, таким же образом был защищен ДНК-каркас — для повышения стабильности и снижения токсичности ДНК-систем.

ДНК-системы были трансфецированы с помощью липосом в наномолярной концентрации (50 нМ), результаты снимались с помощью проточной цитофлуориметрии после 24 и 48 ч инкубации. Полученные данные подчеркнули важность учета сложной структуры внутриклеточной мРНК, так как ДНК-система, содержащая в своем составе «руки», раскручивающие вторичную структуру мРНК гена GFP лидировала в данных экспери-

* Работа выполнена при поддержке программы «Приоритет 2030», а также программы УМНИК, договор № 17789ГУ/2022.

ментах. ДС2 показала 40 % подавления флуоресценции благодаря KRAS-зависимому расщеплению мРНК гена GFP в клетках миелоидного лейкоза против 1,3 % подавления флуоресценции в клетках без KRAS.

Таким образом, впервые было показано подавление экспрессии целевой мРНК в результате взаимодействия БиАСО ДНК-системы и биомаркера онкогена KRAS в клеточной линии миелоидного лейкоза K562. Значимость работы заключается в том, что с помощью новой технологией стал возможен сайленсинг гена, вызывающего интерес, регулируемый экспрессией отличных от гена-мишени aberrантных транскриптов онкогенов. БиАСО технология решает сразу две фундаментальные проблемы. С одной стороны наделяет технологию антисмысловых олигонуклеотидов способностью принимать решение и селективно активировать терапевтическое действие в клетках с экспрессией биомаркеров онкологических заболеваний. С другой стороны повышает эффективность антисмысловой технологии в онкотерапии, за счет открытия возможности сайленсинга клинически-значимых новых генов-мишеней без риска вызова апоптоза или некроза в неизменных тканях. Дальнейшее развитие проекта предполагает адаптацию технологии под клинически значимые биомаркеры рака и гены домашнего хозяйства, таргетирование которых запустит деградацию опухолевых клеток по апоптотическому пути.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-319

ОЦЕНКА РИСКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАЮЩИХ ТАМОКСИФЕН***ASSESSMENT OF DISEASE PROGRESSION
IN ESTROGEN-POSITIVE BREAST CANCER PATIENTS TREATED TAMOXIFEN**Т. А. Дронова¹, Н. Н. Бабышкина¹, Е. М. Слонимская², Н. В. Чердынцева¹¹НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр²Санкт-Петербургский государственный университетT. A. Dronova¹, N. N. Babyshkina¹, E. M. Slonimskaya², N. V. Cherdynitseva¹¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center²Saint Petersburg State University

✉ tanyadronova@mail.ru

Аннотация

Изучен экспрессионный статус ER α , TGF- β R2, pAkt для оценки риска прогрессирования рака молочной железы при назначении лекарственной терапии тамоксифеном. Выявлены дополнительные молекулярно-генетические маркеры прогноза эстроген-позитивного РМЖ, а именно: уровень транскрипционной активности гена *ESR1*, уровень экспрессии TGF- β R2, pAkt и субпопуляций опухолевых клеток, коэкспрессирующих pAkt-/TGF- β R2+.

Abstract

The aim: to study the expression status of ER α , TGF- β R2, pAkt to assess the breast cancer progression when prescribing drug therapy with tamoxifen. *ESR1* gene expression level, TGF- β R2 and pAkt protein expression as well as the populations of pAkt-/TGF- β R2+ cells were identified as additional molecular genetic markers for the prognosis of estrogen-positive breast cancer.

Введение

Лекарственная терапия тамоксифеном в адъювантном режиме является стандартом при лечении эстроген-позитивного рака молочной железы (РМЖ). Несмотря на высокую эффективность данной терапии, рецидив заболевания отмечается примерно у 30 % пациенток [1]. Резистентность к тамоксифену обусловлена дисрегуляцией PI3K/Akt/mTOR каскада за счет активации специфических сигнальных путей, таких, как внутриклеточный путь трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) и двух его рецепторов TGF- β R1, TGF- β R2 [2, 3].

Цель

Анализ транскрипционного и белкового профиля ER α , TGF- β R2, pAkt для оценки риска прогрессирования заболевания у больных эстроген-позитивным раком молочной железы, получавших тамоксифен.

Материалы и методы

Исследованы образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани, полученные во время операционного вмешательства от 141 пациентки (T₁₋₄N₀₋₃M₀). Все пациентки получали комбинированное лечение (хирургическое лечение, лучевая и химиотерапия — по показаниям), а также тамоксифен в адъювантном режиме (5 лет; 20 мг/сутки). На фоне приема тамоксифена у 31 (22 %) пациентки была отмечена резистентность к терапии (рецидив заболевания, либо появление отдаленных метастазов); 110 (78 %) пациенток были чувствительны к лечению. РНК выделена с использованием набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия). Оценка транскрипционной активности генов *ESR1*, *TGF- β R2* и *Akt1* проведена при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США). Процентное содержание TGF- β R2 и pAkt, а также субпопуляций опухолевых клеток pAkt+/TGF- β R2+, pAkt-/TGF- β R2+, pAkt+/TGF- β R2-, pAkt-/TGF- β R2- изучено методом проточной цитофлуориметрии на CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Программное обеспечение «STATISTICA 8.0» и «SPSS 21.0.» использовано для статистической обработки данных.

* Работа проведена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Результаты

Анализ транскрипционной активности исследуемых маркеров показал, что высокий уровень экспрессии генов *ESR1* и *TGF-βR2* значимо ассоциирован с эффективным ответом на тамоксифен ($p = 0,016$ и $p = 0,031$, соответственно). Кроме того, в тамоксифен-чувствительных опухолях отмечен высокий уровень мРНК гена *Akt1*, однако результаты не достигали статистической значимости ($p = 0,116$). Установлено, что высокий процент pAkt-позитивных клеток опухоли является одним из факторов, связанных с неэффективностью лечения тамоксифеном ($p = 0,024$). Высокий уровень экспрессии TGF-βR2, напротив, сопряжен с эффективным ответом на проводимую гормонотерапию ($p = 0,006$). Оценка количества клеток, экспрессирующих комбинации маркеров pAkt/TGF-βR2 показала их значимый вклад в формирование устойчивости/чувствительности опухоли к терапии тамоксифеном. Так показано, что субпопуляция клеток pAkt-/TGF-βR2+ чаще отмечалась в чувствительных к лечению опухолях ($p = 0,001$), тогда как процентное соотношение субпопуляции pAkt+/TGF-βR2+ было выше в резистентных опухолях ($p = 0,006$). На завершающем этапе работы построена математическая модель, позволяющая прогнозировать риск прогрессирования заболевания на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Наиболее информативными факторами неблагоприятного прогноза по данным многофакторного анализа явились: низкая транскрипционная активность гена *ESR1*, наличие в опухоли негативной экспрессии TGF-βR2, позитивной экспрессии pAkt, а также низкое содержание клеточной субпопуляции pAkt-/TGF-βR2+. Чувствительность предложенной модели составила — 96,0 %, специфичность — 66,7 %.

Выводы

В результате проведенной работы найдены потенциальные маркеры, ассоциированные с формированием чувствительного и резистентного к тамоксифену фенотипа РМЖ. Построена математическая модель, позволяющая оценить риск прогрессирования заболевания среди пациенток с эстроген-позитивным РМЖ, получавших тамоксифен в адъювантном режиме.

Литература

1. Davies C., Godwin J., Gray R. et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials // *Lancet*. 2011. Vol. 378(9793). P. 771–784.
2. Baba A. B., Rah B., Bhat G. R. et al. Transforming growth factor-beta (TGF-β) signaling in cancer-A betrayal within // *Front Pharmacol*. 2022. Vol. 13. P. 791272–791287.
3. Yi J. Y., Shin I., Arteaga C. L. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase // *J. Biol. Chem*. 2005. Vol. 280(11). P. 10870–10876.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-320

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК
УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ*****ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF PRIMARY UVEAL MELANOMA CELL CULTURE**М. В. Жильникова^{1,2}, О. С. Троицкая¹, Д. Д. Новак¹, А. А. Нуштаева¹, О. А. Коваль^{1,2}¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*² *Новосибирский государственный университет*M. V. Zhilnikova^{1,2}, O. S. Troitskaya¹, D. D. Novak¹, A. A. Nushtaeva¹, O. A. Koval^{1,2}¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*² *Nososibirsk State University*

✉ m.zhilnikova@g.nsu.ru

Аннотация

Получена первичная культура клеток увеальной меланомы человека и охарактеризованы ключевые поверхностные и внутриклеточные маркеры онкотрансформированных меланоцитов. На основе первичной культуры увеальной меланомы получена трансгенная линия, экспрессирующая флуоресцентный белок mKate2 и люциферазу Luc2.

Abstract

The primary human uveal melanoma (UM) cell culture was established and key surface and intracellular markers of oncotransformed melanocytes were characterized. Based on the primary cell culture, genetically modified cell culture of UM expressing fluorescent protein mKate2 and luciferase Luc2 was created.

Увеальная меланома (УМ) развивается из меланоцитов сосудистой оболочки глаза. Это редкая, но агрессивная опухоль с высоким риском метастазирования, который часто зависит от молекулярных и цитогенетических особенностей онкотрансформированных меланоцитов. При этом системных терапевтических подходов к лечению метастатической УМ на сегодняшний день не разработано, хотя в ходе клинических испытаний тестируется широкий спектр препаратов для таргетной и иммунной терапии опухоли. Поэтому для поиска маркеров заболевания и мишеней для терапии необходима разработка новых клеточных моделей увеальной меланомы.

Целью данной работы было получение и характеристика первичной культуры клеток увеальной меланомы человека для поиска мишеней для таргетной терапии заболевания.

Из образца ткани хориоидальной меланомы, собранного при проведении энуклеации, была получена первичная культура клеток УМ. Для выделения клеток использовали метод механической неферментативной дезагрегации, как было описано ранее [1]. Полученная первичная культура была гетерогенна по клеточному составу: встречались как веретеновидные, так и дендритоподобные меланоциты, однако при культивировании отмечалось преобладание клеток с веретеновидным фенотипом. При исследовании ультраструктуры клеток с помощью электронной микроскопии в их цитоплазме было обнаружено большое количество меланосом на разных стадиях созревания. При кариотипировании клеток культуры были выявлены хромосомные aberrации, характерные для клеток увеальной меланомы: делеции в хромосомах 8p и 6q. Методом вестерн-блота была подтверждена продукция клетками УМ ключевых меланоцитарных (тирозингидроксилаза) и нейтральных (BDNF, TrkB) белков-маркеров.

Чтобы добиться стабильной пролиферации клеток первичной культуры, была проведена оптимизация условий их культивирования. С использованием прибора iCELLigence, позволяющего анализировать пролиферацию клеток в режиме реального времени, была подобрана культуральная среда с добавками, обеспечивающая наиболее активную пролиферацию клеток УМ.

Для поиска потенциальных мишеней противоопухолевых препаратов была проведена оценка уровня рецепторов факторов роста и молекул клеточной адгезии на клетках УМ. Методом проточной цитометрии в первичной культуре УМ были обнаружены клетки, несущие рецепторы эпидермального фактора роста HER2 (24 % клеток культуры) и HER3 (26 %) и молекулы клеточной адгезии Mel-CAM (более 80 %), вовлеченные в процесс метастазирования опухоли.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00285.

На основе линии УМ методом лентивирусной трансдукции была получена линия клеток, экспрессирующая флуоресцентный белок mKate2 и люциферазу Luc2. Продукция клетками данных белков была подтверждена с помощью тестов *in vitro*. Трансгенная линия будет использована для исследования метастатического потенциала клеток УМ методом биoluminesцентной визуализации *in vivo* [2].

Таким образом, полученная линия УМ человека является моделью для поиска потенциальных мишеней для таргетной терапии, а трансгенная линия, экспрессирующая белок mKate2 и люциферазу Luc2, будет полезна для исследования механизмов метастазирования клеток увеальной меланомы.

Литература

1. Nushtaeva A.A. et al. Establishment of primary human breast cancer cell lines using «pulsed hypoxia» method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice // *Cancer Cell International*. 2019. Vol. 19, № 1. P. 1-19.
2. Sato K. Bioluminescence Imaging for Evaluation of Antitumor Effect In Vitro and In Vivo in Mice Xenografted Tumor Models // *Bioluminescence: Methods and Protocols*. 2022. Vol. 1. P. 307-315.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-321

ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ НОКДАУН ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ГЕНОВ *LAWC* И *TRF2* В СОМАТИЧЕСКИХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ТКАНЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER****TISSUE-SPECIFIC KNOCKDOWN OF OVERLAPPING *LAWC* AND *TRF2* GENES IN SOMATIC AND REPRODUCTIVE TISSUES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Е. Л. Заволока, Ю. Е. Воронцова, Р. О. Черезов, О. Б. Симонова

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва

E. L. Zavoloka, Yu. E. Vorontsova, R. O. Tcherezov, O. B. Simonova

Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow

✉ workerbh000@gmail.com

Аннотация

Перекрывающиеся гены обнаружены у всех модельных видов эукариот. Однако, регуляция их экспрессии и механизмы возникновения межгенных перекрытий исследованы недостаточно. В работе мы изучали экспрессию двух перекрывающихся генов *D. melanogaster lawc* и *Trf2*, на фоне нокадауна их разнонаправленных транскриптов *in vivo*. Мы показали, что антисмысловые *lawc*-транскрипты могут участвовать в контроле и координировании экспрессии смысловых транскриптов *Trf2*.

Abstract

Overlapping genes have been found in all model eukaryotic species. However, the regulation of their expression and the mechanisms of occurrence of intergene overlaps have not been studied enough. In this work, we've researched the expression of two overlapping genes, *lawc* and *Trf2*, in the *D. melanogaster* genome by knockdown of bidirectional transcripts of these genes *in vivo*. We demonstrated that antisense *lawc* transcripts may be involved in the control and coordination of the expression of *Trf2* sense transcripts.

Значительная доля генома эукариот может транскрибироваться в разных направлениях — смысловом и антисмысловом. Это может приводить к возникновению общих для разных генов регуляторных зон и появлению перекрывающихся транскриптов. Имеются данные, что антисмысловая транскрипция является дополнительным способом регуляции экспрессии генов [1].

Исследования антисмысловой транскрипции поднимают несколько важных вопросов. Во-первых, если два гена расположены на противоположных цепях, формируют ли их перекрывающиеся транскрипты РНК-дуплекс? Если да, то каким образом этот дуплекс влияет на молекулярно-генетические процессы, происходящие в клетке? Если же РНК-дуплекс не формируется, то при каких условиях и какие факторы предотвращают образование двухцепочечной молекулы РНК и его последствия [2]?

Биоинформационный анализ геномов и транскриптомов даёт лишь общие сведения о количестве и структуре антисмысловых транскриптов и перекрывающихся генах. Поэтому актуально исследовать функции естественных антисмысловых транскриптов на хорошо изученных генетических системах *in vivo* и *in vitro*, в конкретных ситуациях.

Ген дрозофилы *Trf2* (*Tbp-related factor 2*) перекрывается с геном *lawc* (*leg arista wing complex*) и разнонаправленные транскрипты этих генов, вероятно, могут участвовать в координировании своей экспрессии в онтогенезе. Оба гена функционально родственны и их продукты участвуют в регуляции транскрипции других генов. Несмотря на это функции гена *lawc* изучены слабо, ввиду отсутствия его мутаций [3].

Мы решили использовать систему перекрывающихся генов *lawc/Trf2* для исследования эволюционно сложившегося механизма регуляции сбалансированной экспрессии прямых и обратных транскриптов этого комплекса в соматических и герминативных тканях.

В результате генетических экспериментов по направленному подавлению экспрессии транскриптов генов *Trf2* и *lawc in vivo* в тканях глазного поля, антенны и в репродуктивных клетках с использованием системы *Gal4/UAS* мы показали, что снижение экспрессии гена *lawc* приводит к падению уровня экспрессии гена *Trf2*. На это указывают одинаковые нарушения морфологии глаз, антенн и репродуктивных органов, вызванные подавлением

* Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н. К. Кольцова РАН, в рамках выполнения ГЗ ИБР РАН № 0088-2021-0007.

lawc и *Trf2*, а также данные анализа их экспрессии методом ПЦР РВ. Мы сделали вывод, что в этих тканях оба гена работают конкордантно. Однако подавление экспрессии этих генов в соматических фолликулярных клетках вызывало различные нарушения. Следовательно, в этих клетках оба гена работают независимо, возможно с альтернативных промоторов. Ген *Trf2* является важным фактором базовой транскрипции, поэтому он имеет некое предпочтение в использовании общей с геном *lawc* регуляторного района в соматических и репродуктивных тканях. Тем не менее, особая функция *lawc* в формировании эпителия фолликулярных клеток, возможно, стала препятствием на пути «захвата» геном *Trf2* его регуляторного района, что позволило *lawc* сохранить свою независимость от *Trf2* в этих клетках.

Литература

1. Wright, B.W., Molloy, M.P. & Jaschke, P.R. Overlapping genes in natural and engineered genomes // Nat Rev Genet. 2022. P. 154–168.
2. Черезов Р.О., Симонова О.Б. Перекрывающиеся гены и антисмысловая транскрипция у эукариот // Генетика. 2014. Т. 50, № 7. С.749–763.
3. Модестова Е.А., Воронцова Ю.Е., Корочкин Л.И., Симонова О.Б. Получение летальных мутаций гена *leg-arista-wing complex* у *D. melanogaster* // ДАН. 2005. Т. 403, №4. С. 564–565.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-322

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АВТОАГРЕГАЦИИ ЭНТЕРОПАТОГЕННОЙ *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ, ОСНОВАННОЙ НА МАГНИТНОЙ ЛЕВИТАЦИИ*

STUDY OF THE MECHANISMS OF AUTO-AGGREGATION OF ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 USING A SYSTEM BASED ON MAGNETIC LEVITATION

А. Е. Захарченко, П. А. Домнин, С. А. Ермолаева

*Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*

A. E. Zakharchenko, P. A. Domnin, S. A. Ermolaeva

Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ zakharchenko_a_e@mail.ru

Аннотация

В работе проведено сравнение способности к автоагрегации бактерии энтеропатогенной *Escherichia coli* O157:H7 и ее мутанта по фактору транскрипции RcsB с использованием новой системы, основанной на магнитной левитации. Было установлено, что фактор транскрипции RcsB влияет на процесс автоагрегации через контроль продукции поверхностных фимбрий- курлей.

Abstract

The paper compares the autoaggregation ability of the enteropathogenic bacterium *Escherichia coli* O157:H7 and its transcription factor RcsB mutant using a new system based on magnetic levitation. It has been found that the transcription factor RcsB affects the process of autoaggregation through the control of curli-fimbria.

Многие заболевания, вызываемые патогенными микроорганизмами, связаны со способностью штаммов формировать трехмерные структуры, не прикрепленные к поверхности — автоагрегаты. Для изучения процессов автоагрегации *in vitro* необходима модель, предотвращающая осаждение автоагрегата. В данной работе мы сообщаем о разработке системы на основе магнитной левитации и ее успешном применении для изучения механизмов автоагрегации энтеропатогенной *Escherichia coli* серотипа O157:H7 (далее *E. coli* O157). *E. coli* O157 способны к автоагрегации, хотя и не продуцируют амилоидные волокна курли, которые, как было показано, необходимы для формирования автоагрегатов лабораторными штаммами *E. coli* K12 [3]. Ранее нами был изолирован мутантный штамм *E. coli* O157, продуцирующий курли [1]. В данной работе, мы исследовали эффект курлей на автоагрегацию и установили генетические механизмы, контролирующие этот процесс, используя разработанную нами экспериментальную систему на основе магнитной левитации (биоассемблер).

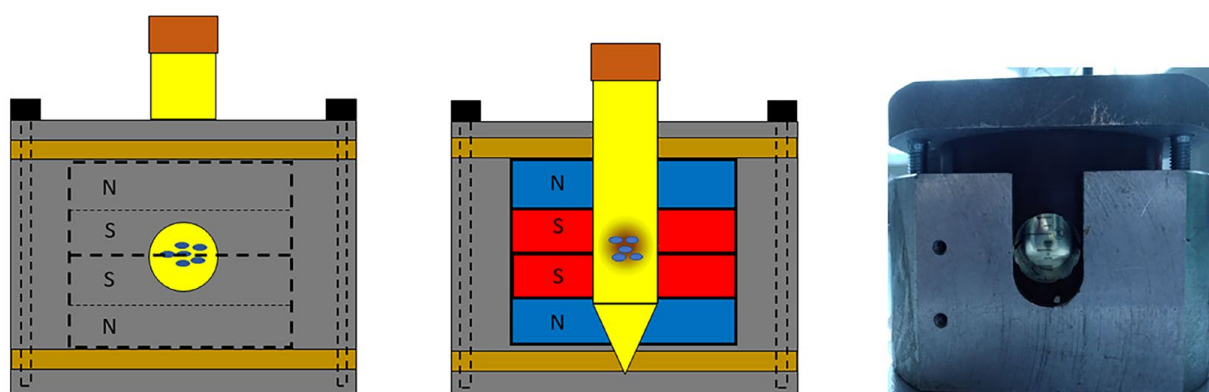
Цель

Изучение влияния продукции курлей на автоагрегацию энтеропатогенных бактерий *E. coli* O157 и выяснение генетических механизмов, контролирующих этот процесс.

Материалы и методы

В работе использовали систему, состоящую из двух постоянных магнитов сплава NdFeB (неодим-железо-бор), размещенных одноименными полюсами друг к другу (см. рисунок). *E. coli* O157 ATCC43890 и его производный продуцирующий курли мутант СРМ1 выращивали в биоассемблере в среде LB с 20 мМ гадобутрола, усиливающего эффекты неоднородного магнитного поля [2]. Наличие курлей идентифицировали по красной окраске колоний на LB агаре с конго красным в концентрации 25 мкг/мл. Показатели эффективности автоагрегации: размер агрегата, количество бактерий в агрегате и культуральной жидкости, количество связанного бактериями красителя конго красный. Количество красителя определялось фотометрически при длине волны 450 нм [1].

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения России, тема № 056-00093-22-04 «Разработка тест-системы для экспресс-определения антибиотикорезистентности патогенных бактерий на основе *in situ* анализа подвижности бактериальных клеток».



Устройство биоассемблера

Результаты

В биоассемблере бактерии, помещенные в градиент магнитного поля, собираются в центре рабочего объема и не седиментируют. По истечении 5 дней, размеры агрегатов мутанта СРМ1 и дикого штамма составили $9,8 \text{ мм}^3$ и $33,6 \text{ мм}^3$ соответственно. Соотношение числа бактерий, находившихся в агрегатах и среде, для мутантного и исходного штаммов составило 12,1 и 1,8 соответственно. При близких значениях общего числа клеток ($1,7 \pm 0,6 \times 10^7$ КОЕ/мл и $1,8 \pm 0,2 \times 10^7$ КОЕ/мл для СРМ1 и АТСС43890 соответственно) уменьшение размера агрегата мутанта, несмотря на увеличение в нем количества бактерий, связано с образованием более тесных связей между клетками в результате продукции курлей. Это подтвердилось фотометрическим анализом количества красителя, связанного курлями: для мутанта значение было больше в 2,3 раза по сравнению с исходным штаммом [1]. Полученные результаты свидетельствуют о более эффективной автоагрегации штамма, продуцирующего курли.

Для идентификации механизмов, определяющих образование курлей и гиперавтоагрегирующий фенотип СРМ1, картировали мутацию: замена Ser206Phe в $\alpha 10$ -спирали ДНК-связывающего домена фактора транскрипции RcsB. RcsB в составе гетеродимера RcsB/RcsA репрессирует структурный оперон *csgAB*, кодирующий белки курлей; мы предположили, что замена Ser206Phe ослабляет взаимодействие с таргетным промотором оперона *csgBA*. Для подтверждения в СРМ1 ввели плазмиду *rRcsA* с целью гиперэкспрессии RcsA и стабилизации взаимодействия димера RcsB/RcsA с ДНК. В результате комплементации был восстановлен фенотип дикого типа [1].

Вывод

С помощью системы, основанной на магнитной левитации, установили, что при мутации в белке RcsB, участвующем в регуляции продукции курлей, у бактерий *E.coli O157* усиливается способность к автоагрегации. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности использования разработанной нами системы для изучения генетических механизмов автоагрегации.

Литература

1. Домнин П. А., Захарченко А. Е., Реджепов Д. Т., Ермолаева С. А. Система на основе магнитной левитации для изучения механизмов бактериальной флокуляции и аутоагрегации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2023. URL: 1:38–43. URL: https://www.researchgate.net/publication/370034523_A_magnetic_levitation-based_system_to_study_the_mechanisms_of_bacterial_flocculation_and_autoaggregation
2. Domnin P.A., Parfenov V.A., Kononikhin, A.S. et al. Combined Impact of Magnetic Force and Spaceflight Conditions on *Escherichia coli* Physiology // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. P. 1837. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35163759/>
3. Laganenka L., Colin R., Sourjik V. Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli* // Nature Communications. 2016. Vol. 7. P. 12984. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27687245/>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-323

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОВ ПОЛУКАРЛИКОВОСТИ RHT (-B1A, -B1B, D1A, D1B) И КРУПНОЗЕРНОСТИ TAGW8-B1A, TAGS5-3A ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ *

USING OF RHT (-B1A, -B1B, D1A, D1B) SEMI-DWARFISM GENES AND COARSE-GRAINED TAGW8-B1A, TAGS 5-3A GENES FOR INCREASING THE PRODUCTIVITY OF SPRING WHEAT

Л. Зотова, А. Жумалин, А. Гаджимурадова, И. Жирнова, Ф. Абдуллоев, А. Нуралов

Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина, Астана, Казахстан

L. Zotova, A. Zhumalin, A. Gajimuradova, I. Zhirnova, F. Abdulloyev, A. Nuralov

¹S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University, Astana, Kazakhstan

✉ lupezo_83@mail.ru

Аннотация

Для ускорения процесса отбора гибридов и подбора родительских форм для скрещиваний, важно обратить внимание как на фенотипический, так и на генетический потенциал растений. С целью повышения урожайности за счет подбора оптимальных параметров для отбора пшеницы по признакам короткостебельности и крупнозерности в условиях засушливого климата, нами были изучены гены «зеленой революции» группы Rht и крупнозерности TaGW, TaGS, и проведен корреляционный анализ между генетическим потенциалом сортов и гибридов пшеницы и их фенотипическим проявлением в условиях засухи. Результаты исследований показали, что ген Rht-D1b достоверно уменьшает высоту растений на 51,67 %, а также уменьшает длину coleoptily на 30,45 %. При этом ген TaGW8-B1a увеличивает ширину зерна на 13,37 %. Однако, при наличии в геноме генов Rht-D1b, Rht-B1b среднее значение массы 1000 семян составило 35,06 г ($p < 0,05$), тогда как ген Rht-B1b увеличивал ее на 9 % ($p < 0,05$), оба аллеля Rht-D1a, Rht-B1a дают массу 1000 семян 37,96 г ($p < 0,05$). Полученные данные говорят о взаимосвязи фенотипических и генетических параметров у пшеницы между генами крупнозерности и короткостебельности, что дает возможность проводить отбор основываясь на генетических параметрах сортов и гибридов, ускорив за счет этого процесс селекции.

Abstract

To speed up the selection process of hybrids and the selection of parental forms for crosses, it is important to pay attention to both the phenotypic and genetic potential of plants. In order to increase yields by selecting optimal parameters for wheat selection based on short-stemmed and coarse-grained characteristics in a dry climate, we studied the genes of the “green revolution” group Rht and coarse-grained TaGW, TaGS, and carried out a correlation analysis between the genetic potential of wheat varieties and hybrids and their phenotypic manifestation in drought conditions. The results of the studies showed that the Rht-D1b gene significantly reduces the height of plants by 51.67 %, and also reduces the length of the coleoptile by 30.45 %. At the same time, the TaGW8-B1a gene increases the grain width by 13.37 %. However, in the presence of Rht-D1b, Rht-B1b genes in the genome, the average weight of 1000 seeds was 35.06 g ($p < 0.05$), while the Rht-B1b gene increased it by 9 % ($p < 0.05$), both Rht-D1a, Rht-B1a alleles give a mass of 1000 seeds of 37.96 g ($p < 0.05$). The data obtained indicate the relationship of phenotypic and genetic parameters in wheat between the genes of coarse-grained and short-stemmed, which makes it possible to select based on the genetic parameters of varieties and hybrids, thereby speeding up the selection process.

Пшеница является наиболее распространенной и широко востребованной культурой из-за ее экономической и социальной ценности. Эта культура выращивается во всем мире на площади более 220 миллионов гектаров. На нее приходится около 20 % суточной потребности человека в белке. В последние годы глобальное потепление и изменение климата резко повлияли на урожайность сельскохозяйственных культур, в том числе и на пшеницу. Несмотря на большие площади возделывания пшеницы, ее продуктивность значительно ниже, чем риса и кукурузы. Согласно прогнозам к 2050 году население Земли превысит 9,6 млрд человек и для обеспечения продовольственной безопасности населения необходимо увеличить производительность на 60 % [1].

С зеленой революцией индекс урожая пшеницы был улучшен за счет существенного уменьшения высоты, что увеличило производство зерна, а не соломы. Этому способствовало выявление основных генов карликовости,

* Данное исследование было проведено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта молодых ученых NoAP13067944 «Молекулярное SNP-маркирование мягкой пшеницы по генам TaGW, TaGS и Rht на крупнозерность и устойчивость к полеганию» 2022-2024 гг.

© Л. Зотова, А. Жумалин, А. Гаджимурадова, И. Жирнова, Ф. Абдуллоев, А. Нуралов, 2023

которые в настоящее время широко распространены в мировых селекционных программах. Уменьшение высоты, возникающее в результате укорачивания соломы генами пониженной высоты (*Rht*), уже давно предлагается в качестве фактора увеличения индекса урожая пшеницы. Эти гены вызывают накопление белков DELLA, подавляющих рост, в результате чего полукарликовые растения сопротивляются полеганию. Одним из основных признаков, обусловивших увеличение урожайности пшеницы в прошлом, была высота растений, которая систематически снижалась в результате интрогрессии генов *Rht* [2].

В ходе селекционных работ важно также учитывать и наличие генов *TaGW* и *TaGS*, которые определяют размер зерна пшеницы и обеспечивают потенциальную урожайность. *TaGW8B1* положительно связана с размером зерна мягкой пшеницы. Ген *TaGW8-B1a* имеет в первом интроне *InDel* длиной 276 п.н, при этом ген *TaGW8-B1b* не имеет *InDel* длиной 276 п.н. Ген *TaGW8-B1a* обладает значительно большей шириной ядра, значительно большим числом зерен в колосе, большей длиной ядра, большей массой тысячи зерен и большим количеством колосков на колос [3]. Гены *TaGS5-3A* также связаны с массой 1000 зерен и длиной зерна. *TaGS5-3A-T* гаплотип, основанный на SNP T/G в шестом экзоне, достоверно коррелирует с большим размером зерна, более высокой массой 1000 зерен и меньшей высотой растения, длиной колоса и длиной междоузлия под колосом [4].

Целью нашего исследования является проведение отбора сортов и гибридов, полученных путем гибридизации казахстанской и зарубежной селекций (Австралия, Африка, Россия, Китай), основываясь на изучении генетического потенциала сортов и гибридов по генам короткостебельности (*Rht-B1b*, *Rht-D1b*, *Rht-B1a*, *Rht-D1a*) и генам крупнозерности (*TaGW8* и *TaGS5-3A*).

Объектами исследования являются 20 гибридов пшеницы, которые были отобраны как перспективные по фенологическим признакам в течение первых 3 поколений. В качестве родительских форм были выбраны полукарликовые сорта пшеницы китайской селекции (*Xn03*, *Xn04*, *Xn08*, *Xn09*, *Xn10*, *Xn13*), австралийской селекции (*Gladius*, RAC 875, *Wyalkatchem*, *Kite*), африканской селекции (*MMF-044*), высокорослые сорта российской селекции (Саратовская 66, Лютеценс 141) и казахстанской селекции (*Эритроспермум 35*, *Тәуелсіздік 20*, Астана, Акмола 2, Актюбинка, Карабалыкская 25, 90, Карагандинская 22, 25, 29, 30, 31, Шортандинская 2012, 2017). Гибридизацию проводили «твэл»-методом Н.Борлауга ограниченно свободного опыления [5].

Погодные условия за прошедшие 5 лет наблюдались дефицит влаги в период вегетации. Гидротермический индекс в центральной части страны составил в 2018 г. — 0,72, 2019 г. — 0,67, 2020 г. — 0,63, 2021 и 2022 гг. — 0,39. Аналогичный показатель в Северном Казахстане в 2018 г. составил 0,72, в 2019 г. — 0,42, в 2020 г. — 0,89, в 2020 и 2022 гг. — 0,34 и 0,39 соответственно. В период проведения опытов климатические условия в обеих точках были засушливыми или очень засушливыми.

Измерение длины coleoptilia

Длину coleoptilia измеряли у 10 дневных проростков согласно [6].

Массу 1000 зерен проводили согласно ГОСТ 12042-80 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян.

Аmplификацию генов проводили на амплификаторе VeritiPro (Applied Biosystems, USA). Для генов *Rht* использовали праймеры и условия ПЦР описанные [7]. Амплификацию гена *TaGW8* проводили согласно [3]. Для гена *TaGS5-3A* ПЦР проводили согласно [4].

Стандартный статистический анализ результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (*t*) и *p*-значений (*p*) с применением программы Microsoft Excel 2019. Значение *p* вычисляли относительно матери и отца гибрида. Корреляции Пирсона использовались для анализа связей между компонентами урожая и структурными показателями. Анализ между фенотипическими и генетическими показателями проводили с использованием программы SPSS version 22.0 с непараметрическим тестом (тест Мэна–Уитни).

Результаты исследований

Согласно молекулярно-генетическому анализу короткостебельные сорта содержали в своем геноме хотя 1 из генов *Rht-B1b*, *Rht-D1b*. RAC 875, MMF-044, *Gladius* содержали один ген *Rht-D1b*. Сорт *Xn-09* имел в геноме все 4 аллеля гена *Rht* при высоте $64,74 \pm 0,87$ см и длине coleoptilia $5,19 \pm 0,06$ см. Что касается сортов российской и казахстанской селекций все сорта содержали от одного до двух генов *Rht-B1a* и *Rht-D1a* при средней высоте $67,17 \pm 0,3$ см при длине coleoptilia $4,8 \pm 0,05$ см. Сорт Астана, Акмола 2 и Шортандинская 2012 имели в геноме ген *Rht-D1b/Rht-B1b* с высотой 66–68 см и длиной coleoptilia 4,18–5,54 см. Гибриды имели неоднозначное наследование генов и фенотипическое их проявление. Так гибриды WH 131, WH 132, WH 133, WH 134, WH 135, WH 137, WH 138, WH 139, WH 141, WH 142, WH 145, WH193 имели в геноме как положительный аллель, так и отрицательный средняя высота у них составила $50,9 \pm 0,3$ при длине coleoptilia $4,3 \pm 0,07$ см, среди них у гибридов WH 133, WH 134 и WH 137 выше 5 см.

Анализ продуктивности по генам *TaGW8* и *TaGS3A* достоверно показал более высокие значения массы зерен и их количество на колос. Так, наличие обоих генов среди родительских форм отмечено у сортов RAC 875, *Xn-10*, *Wyalkatchem* и Карагандинская 22. При этом SNP-маркер на ген *TaGW8* указывает на значительно более

высокий показатель количества зерен на один колос. Среди гибридов унаследовавших оба гена выявлен только WH190 (XN 10 x Карагандинская 22), при этом как у гибрида, так и у родителей отмечается наиболее высокие показатели массы 1000 семян 40,7–43,4 г, и количество зерен в колосе 36–41 шт. Наибольший размер зерна отмечен у гибрида WH190 — 36,4±2,98 мм², при том что у родителей данный показатель не превышал 28 мм². Среди родительских форм несущих положительный полиморфизм гена TaGW8 являются: Тауелсиздик 20 (38,8 ± 0,25), Эритроспермум 35 (37,74 ± 0,13), Карабалыкская 25 (37,74 ± 0,13), Gladius (31,42 ± 0,17), Шортандинская 2017 (35,64 ± 0,2), Xn-08 (40,1 ± 0,2), Xn-13 (38,76 ± 0,23), Акмола 2 (34,84 ± 0,27), Xn-03 (40,84 ± 0,1), Актюбинская (35,38 ± 0,4). Из гибридов наличие положительного полиморфизма выявлено у WH 139 (26,24 ± 0,24), WH 142 (36,16 ± 0,17), WH 145 (40,68 ± 0,25), WH192 (45,42 ± 0,23). При этом гибрид WH 139, полученный из комбинации Xn-13 и Wyalkatchem с массой семян 38,76 ± 0,23 и 33,92 ± 0,12, и количеством зерен 33,8 ± 0,5 и 22,6 ± 0,51, соответственно, имел показатель количества зерен 25,2 ± 0,37. Это может свидетельствовать регрессии признака, что может говорить о возможности проявления признака в дальнейших поколениях. Ген TaGS обнаружен у гибрида WH 137 (30,8 ± 0,66 шт.) и сорта Карабалыкская 90 (34,8 ± 0,37 шт.). Среди образцов, у которых не выявлено ни одного гена насчитывалось 23 образца.

Чтобы проанализировать влияние различных генетических аллельных вариаций на агрономические признаки, мы использовали информацию о 33 родительских материалах для анализа генетических эффектов Rht-B1b, Rht-D1b, TaGS-3A и TaGW 8. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения SPSS версии 22.0 с непараметрическими тестами (критерий Манна-Уитни). Результаты показали, что TaGW8 значительно увеличил ширину зерна пшеницы на 13,37 %. Одновременно Rht-D1b значительно снизил высоту растений и укоротил длину coleoptилей на 51,67 и 30,45 % соответственно.

Таким образом, у растений, несущих гены короткого стебля Rht-D1b и Rht-B1b, средний вес 1000 ядрышек составлял 35,06 г ($p < 0,05$), в то время как при наличии в геноме только одного гена Rht-B1b вес 1000 ядрышек составлял 38,21 г ($p < 0,05$), в то время как при нулевом генотипе оба аллеля показали значение 36,8 г ($p < 0,05$). Однако у высокорослых сортов и гибридов значение массы 1000 зерен было ниже: нулевые генотипы для аллелей Rht-D1a и Rht-B1a дают массу 1000 семян 37,96 г, в присутствии аллеля Rht-B1a — 36,4 г, Rht-D1a — 35,8 г, с обоими аллелями — 37,4 г ($p > 0,05$). Однако эти аллели влияют на величину количества семян в колосе. Так, наличие двух аллелей Rht-D1a и Rht-B1a дает величину зерен на колос (24,1 шт.), при наличии только одного аллеля Rht-B1a (21,5 шт.; $p > 0,05$). При наличии обоих аллелей Rht-D1b и Rht-B1b образуется 18,5 шт. семян на колос.

Выводы

По результатам корреляционного анализа между фенотипическими признаками и генетикой можно сделать вывод, что при выборе родительских форм необходимо, как минимум, учитывать наличие в геноме генов короткостебельности и массы 1000 семян. Так, при наличии генов Rht-D1b Rht-B1b совместно с генами TaGW8 и TaGS5-3A в геноме родителей, появление продуктивных полукарликовых гибридов с длинным coleoptилем и крупнозерностью возрастает. По результатам проведенных экспериментов нами отобраны перспективные продуктивные родительские формы Карагандинская 22, Саратовская 66, Xn-10, Xn-08 и гибриды WH134, WH136, WH137, WH145, WH190, WH192, которые показали оптимальную высоту, с длиной coleoptиля и крупнозерностью, повлиявших на повышение урожайности в зонах с засушливым климатом.

Литература

1. FAO. 2022. Crop Prospects and Food Situation: Quarterly Global Report 2022. September. №. 3. URL: <https://www.fao.org/3/cc2300en/cc2300en.pdf>
2. Pearce S., Saville R., Vaughan S.P. et al. Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat // Plant Physiol. 2011. Vol. 157(4). P. 1820–1831.
3. Yan X., Zhao L., Ren Y. Genome-wide association study revealed that the TaGW8 gene was associated with kernel size in Chinese bread wheat // Sci Rep. 2019. Vol. 9. P. 1262–1273.
4. Ma L., Li T., Hao C. et al. TaGS5-3A, a grain size gene selected during wheat improvement for larger kernel and yield // J. Plant Biotechnol 2016. Vol. 14. P.1269–1280.
5. Borlaug N.E. Wheat breeding and its impact on world food supply // WheatGenet. Symp. 1980. – P. 36.
6. Sidhu J.S., Singh D., Gill H.S et al. Genome-Wide Association Study uncovers novel genomic regions associated with coleoptile length in hard winter wheat // Front. Genet. 2020. Vol. 10. P. 685–692.
7. Ellis H., Spielmeier W., Gale R., Rebetzke J., Richards A. «Perfect» markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat // Theor Appl Genet. 2002. Vol. 105(6-7). P. 1038–1042.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-324

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИОНОВ СЕРЕБРА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ*

USING OF SILVER IONS TO STUDY COPPER METABOLISM IN MAMMALS

Е. Ю. Ильичева¹⁻³, Д. Н. Магазенкова¹⁻³, В. Е. Рекина³, З. М. Джассим¹, М. Фаррух¹, Л. В. Пучкова¹⁻³¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра ВеликогоE. Yu. Ilicheva¹⁻³, D. N. Magazenkova¹⁻³, V. E. Rekina³, Z. M. Jassem¹, M. Farroukh¹, L. V. Puchkova¹⁻³¹ITMO University, Saint Petersburg²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg³Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University

✉ ilichevaey@itmo.ru

Аннотация

Медь является незаменимым микроэлементом, так как входит в состав ряда жизненно важных ферментов. В работе продемонстрирована возможность изучения метаболизма меди (ММ) млекопитающих с использованием ионов серебра. Показано существование межорганной регуляции ММ, возможность Cu(I) и Cu(II) транспортироваться в клетку, используя разные транспортеры, а также влияние статуса меди на рост опухолей.

Abstract

Copper is an essential trace element playing important roles in various biological processes. The study demonstrates the possibility of studying the copper metabolism (CM) in mammals using silver ions. The existence of inter-organ cross-talk of CM, the ability of Cu(I) and Cu(II) to be transported into the cell using different transporters, as well as the effect of copper status on tumor growth are discussed.

Медь входит в группу эссенциальных микроэлементов. Она является каталитическим и структурным кофактором ферментов, контролирующих жизненно важные процессы (клеточное дыхание, защиту от свободных радикалов, синтез нейромедиаторов, созревание нейропептидов, баланс железа и формирование соединительной ткани). Помимо этого, медь принимает участие в неоваскуляризации, сигналинге, регуляции транскрипции, по существу являясь вторичным мессенджером. В то же время в свободном состоянии медь является токсичным агентом. Поэтому поглощение, распределение и выведение меди строго контролируются высококонсервативной метаболической системой, любые нарушения в работе которой ведут к медь-индуцируемому образованию АФК, запуску окислительного стресса, что, повышает риск развития нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. В связи с этим актуальным является изучение механизмов транспорта меди и коррекция ее дисгомеостаза. Решение этих задач требует детального изучения неизвестных звеньев системы, обеспечивающей поддержание баланса меди в организме, для чего могут быть использованы несколько подходов, одним из которых является использование ионов серебра. Такой выбор обусловлен тем, что ионы меди и серебра изоэлектронны, серебро связывается медь-транспортными белками и транспортируется по тем же путям, что и медь.

Исследования влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих показали, что и хлорид серебра, добавленный в пищу животных, и серебро в виде наночастиц (введенное внутривенно, внутривенно или перорально) в течение одной недели приводят к снижению статуса меди в сыворотке крови: уменьшению концентрации меди и исчезновению оксидантной активности церулоплазмينا (ЦП) — основного медь-транспортного белка. При этом активность других медь-зависимых ферментов и содержание меди в органах не изменялись. После отмены инъекций все показатели восстанавливались в течение одной недели. Однако, если животные получали ионы серебра с пищей в течение 6 месяцев с первого дня жизни, у них в крови появлялась дополнительная быстросекретирующаяся форма ЦП, которая не являлась продуктом печени, а синтезировалась и секретировалась клетками белой жировой ткани.

Поскольку ЦП сыворотки крови является основным донором меди для клеток негепатоцитарных рядов, мы исследовали влияние дефицита ЦП-ассоциированной меди, вызванной введением ионов серебра, на рост гетеро-

* Работа выполнена при поддержке грантов РФФ 20-74-10087 и РФФИ 20-515-7813.

© Е. Ю. Ильичева, Д. Н. Магазенкова, В. Е. Рекина, З. М. Джассим, М. Фаррух, Л. В. Пучкова, 2023

логичной перевитой опухоли НСТ116 кишечника человека у иммунодефицитных мышей и аутологичной аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей Balb/c. В случае опухоли НСТ116 в группе мышей, которые начали получать серебро одновременно с перевиванием опухоли в пяти случаях их шести опухоли не смогли развиваться. В то же время у животных, которые получали серебро в течение одной недели до перевивания опухоли, и к моменту начала эксперимента оксидазная активность в сыворотке крови этой группы не регистрировалась, опухоли росли быстрее, чем в контроле. У мышей с асцитной АКЭ введение наночастиц серебра одновременно с перевиванием опухоли вело к увеличению выживаемости мышей. В то же время, выживаемость мышей с солидной АКЭ была ниже, чем у мышей контрольной группы. Предобработка наночастицами серебра мышей с солидной и асцитной АКЭ не приводила к изменению выживаемости животных. Все это сопровождалось изменением статуса меди в сыворотке крови мышей и изменением уровня экспрессии медь-ассоциированных генов.

Для понимания взаимосвязи между метаболизмом меди и опухолевым ростом мы изучили особенности импорта Cu(I) и Cu(II) на клетках с CRISPR/Cas9 нокаутом генов транспортеров меди CTR1, DMT1 и двойным нокаутом этих генов (DKO). Использование AgCl и противоопухолевого препарата цисплатина, которые транспортируются в клетку одинаково через белок CTR1, который отвечает и за транспорт меди(I), показали, что клетки с нокаутом CTR1 и DKO, в целом, более устойчивы к AgCl и цисплатину. При этом серебро, хоть и в гораздо меньшем количестве, проникает во все нокаутные клетки. Кроме того, нокаут генов транспортеров меди, не приводит к развитию ее полного дефицита в клетке.

Полученные данные показывают успешность использования серебра для изучения метаболических путей, в которых медь требуется в качестве основного участника. Мы показали возможность существования межорганной регуляции метаболизма меди, а также медь-зависимого онкосупрессора или онкосупрессорной системы. Кроме того, получены данные, подтверждающие гипотезу о том, что Cu(I) и Cu(II) транспортируются в клетку разными путями.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-325

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ *BOS GRUNNIENS* И *BOS TAURUS*
НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *CEP112 (CCDC46)******DIFFERENTIATION OF *BOS GRUNNIENS* AND *BOS TAURUS* BASED
ON *CEP112 (CCDC46)* GENE POLYMORPHISM**Ж. Т. Исакова¹, К. Б. Чекиров¹, В. Н. Кипень²¹Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, Киргизия²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, МинскZh. T. Isakova¹, K. B. Chekirov¹, V. N. Kipen²¹Scientific Research Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyzstan²Institute of Genetics and Cytology of the NAS of Belarus, Minsk

✉ jainagul@mail.ru, v.kipen@igc.by

Аннотация

На практическом материале впервые в Кыргызской Республике подтвержден дифференцирующий потенциал SNP Chr.19:g.63181970C>G в гене *CEP112 (CCDC46)* для различения *Bos grunniens* и *Bos taurus*.

Abstract

For the first time in the Kyrgyz Republic, the differentiating potential of SNP Chr.19:g.63181970C>G in the *CEP112 (CCDC46)* gene for distinguishing between *Bos grunniens* and *Bos taurus* was confirmed.

Дифференциация близкородственных биологических видов с использованием методов молекулярно-генетического анализа имеет важное значения для селекционных процессов при разведении сельскохозяйственных животных, создании гибридных линий, поддержания генетической чистоты пород, линий, отводок. Подход к дифференциации *Bos grunniens* и *Bos taurus* на основании полиморфизма SNP будет способствовать поддержанию генетической обособленности данных видов, и, как следствие, выявлению гибридных особей.

Биологическим материалом для молекулярно-генетического исследования послужили ушные выщипы, взятые у взрослого поголовья: 35 домашних яков (*Bos grunniens*), разводимых в высокогорном регионе Калмак-Ашуу (Кочкорский район, Нарынская область, Кыргызская Республика), — выборка YAK, а также ушные выщипы, взятые у взрослого поголовья 45 коров (*Bos taurus*) трех пород: Абердин-ангуская ($n = 15$), Голштинская ($n = 15$) и Алатауская ($n = 15$), — выборка COW. На основании молекулярно-генетического анализа 15 STR-локусов отобранные особи не имели родственных отношений. Выделение ДНК проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Выбор SNP для молекулярно-генетического анализа был обусловлен собственными результатами, полученными на этапе биоинформатического анализа 1740 SNP для геномов 305 особей из проектов PRJNA217895, PRJNA285834, PRJNA74739, PRJNA508864, PRJNA531398, PRJNA431934, PRJNA762180 [1]. Для автоматизации процесса поиска нуклеотидных последовательностей *in silico*, фланкирующих искомым аллель, использовали самостоятельно разработанную программу GENIS на языке программирования Python v.3.10 с использованием среды разработки программного обеспечения Jupyter Notebook.

Определение генотипа для 80 особей из рода *Bos* по SNP Chr.19:g.63181970C>G (*CEP112*) [Chr 19 (AC_000176.1); *Bos_taurus_UMD_3.1.1* (GCF_000003055.6)] осуществляли с использованием Real-time PCR (см. рисунок).

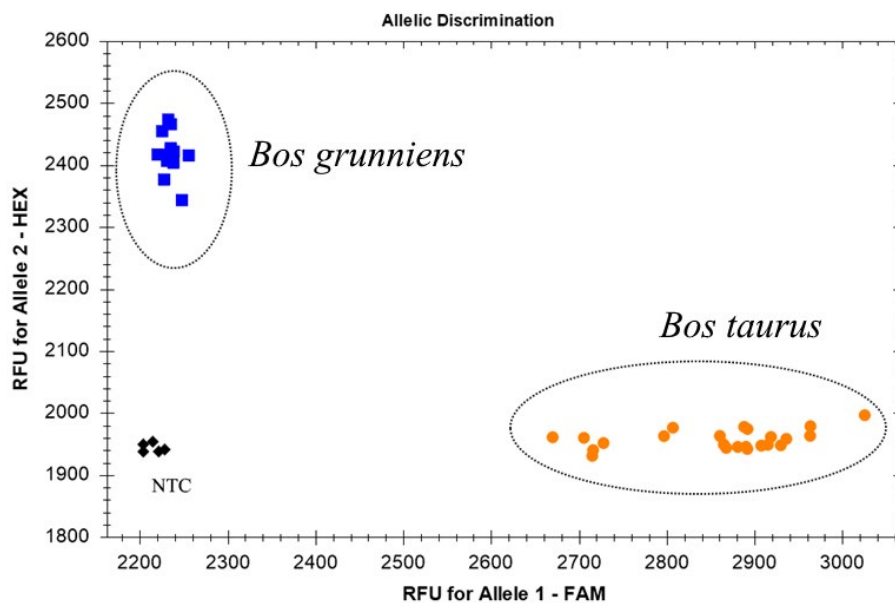
Дифференцирующий потенциал SNP определяли с использованием ROC-анализа в SPSS v.20.0. При наличии нижней границы асимптотического 95 % доверительного интервала более 0,8 для параметра AUC (площадь под кривой) полиморфизм позиционировался как генетический маркер с высоким дифференцирующим потенциалом.

Для полиморфизма Chr.19:g.63181970C>G (*CEP112*) частота распространенности аллеля G в выборке YAK составила 100 % (GG — 35 образцов), аллеля C в выборке COW — 97,8 % (CC — 43 образца, CG — 2 образца).

* Биоинформатический анализ выполнен в рамках гранта БРФФИ Б23-060 (2023-2025 гг.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© Ж. Т. Исакова, К. Б. Чекиров, В. Н. Кипень, 2023



Аллельная дискриминация для полиморфизма Chr.19:g.63181970C>G (*CEP112*), адаптировано из ПО Bio-Rad CFX Manager 3.1

Значение параметра AUC составило 1,0 (p-level — 2.12E-14). Ранее, на основании биоинформатического анализа, дифференцирующий потенциал данного SNP был сопоставим, значение AUC составило 0,998 (p-level — 7.15E-18).

Таким образом, на практическом материале впервые в Кыргызской Республике подтвержден дифференцирующий потенциал SNP Chr.19:g.63181970C>G для различения *Bos grunniens* и *Bos taurus*. В перспективе планируется расширить исследования в данной области: проверить дополнительные SNP, увеличить выборки и провести совместный анализ нескольких SNP для разработки модели дифференциации *Bos grunniens* и *Bos taurus*.

Литература

1. Кипень В. Н., Исакова Ж. Т., Дифференциация *Bos grunniens* и *Bos taurus* на основании полиморфизма SNP // Сб. тезисов Науч. конф. с междунар. участием, посвященной 85-летию со дня рождения академика Ю. П. Алтухова. Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН. М., 2022. С. 32.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-326

ВЫЯВЛЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ РАЗЛИЧИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ МУТАЦИИ ГЕНА CYP21A1***DETECTION OF TRANSCRIPTOMIC DIFFERENCES IN CELL POPULATIONS OF ADRENOCORTICAL CELLS IN NORMAL CONDITIONS AND IN CYP21A1 GENE MUTATIONS**

С. А. Казиахмедова, О. В. Глазова, П. Ю. Волчков

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

С. А. Kaziakhmedova, O. V. Glazova, P. Yu. Volchkov

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ kaziakhmedova.sa@phystech.edu

Аннотация

Надпочечники — важный эндокринный орган, производящий кортикостероиды и катехоламины. Патологии, приводящие к снижению эндогенного производства всех или некоторых надпочечниковых гормонов, зачастую обусловлены мутациями в генах белков, отвечающих за различные этапы их синтеза. Одним из самых распространенных нарушений подобного типа является врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН), вызванная мутациями гена *CYP21A2* (*Cyp21a1*). В самых тяжелых случаях течение данного заболевания может приводить к таким жизнеугрожающим состояниям, как адренальный криз. Выявление различий транскрипционного профиля адренокортикальных клеток в норме и патологии поможет изучить течение заболевания на более глубоком, молекулярном уровне, что осуществимо благодаря бурному развитию омиксных технологий. Цель данной исследовательской работы определить значимые различия в клеточных популяциях адренокортикальных клеток мышей дикого типа и с мутацией гена *Cyp21a1*.

Abstract

The adrenal glands are an important endocrine organ producing corticosteroids and catecholamines. Pathologies that lead to a decrease in the endogenous production of all or some of the adrenal hormones are often caused by mutations in the genes of proteins responsible for various stages of their synthesis. One of the most common disorders of this type is congenital adrenal dysfunction (CAD) caused by mutations in the *CYP21A2* (*Cyp21a1*) gene. In the most severe cases, the course of this disease can lead to such life-threatening conditions as an adrenal crisis. Identification of differences in the transcriptional profile of adrenocortical cells in normal and pathological conditions will help to study the course of the disease at a deeper, molecular level, which is feasible due to the rapid development of omics technologies. The purpose of this research work is to determine significant differences in the cell populations of adrenocortical cells in wild-type mice and mice with mutations in the *Cyp21a1* gene.

Поскольку надпочечник представляет собой орган, состоящий из разных зародышевых листков, гомеостаз тканей эмбриона и взрослого органа является сложным и не до конца изученным. Разработка методов лечения патологий надпочечников на основе генетических и клеточных технологий является актуальной научно-технической задачей. Остается еще много пробелов как в разработанных протоколах, так и в понимании молекулярной основы происходящих процессов. Данные анализа scRNA-seq могут помочь более точно охарактеризовать профиль экспрессии стволовых и дифференцированных клеток, а также промежуточных состояний, в разных тканях, что позволит контролировать правильность его реализации на разных этапах дифференцировки *in vitro*.

Материалы и методы

В ходе работы был оптимизирован протокол пробоподготовки надпочечников мыши для секвенирования РНК единичных клеток, разработан алгоритм биоинформатического анализа данных, выявлены субпопуляции клеток коры надпочечников и определены ключевые различия в транскрипционном профиле клеток надпочечников мышей в норме и при мутации в *Cyp21a1*. Общая схема эксперимента представлен ниже (рис. 1).

Нами было отсеквенировано 4 группы мышей, различающихся по полу (самки и самцы) и по генотипу (с/без мутации *Cyp21a1*). Надпочечник очищали от жировой ткани, затем гомогенизировали с использованием коллагеназы I типа. Полученные суспензии клеток для каждой группы далее использовались для приготовления библиотек для секвенирования с использованием технологии Chromium 10x.

* Соглашения о предоставлении субсидии из федерального бюджета федеральному бюджетному или автономному учреждению на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) от 13.01.2023 № 075-03-2023-106.

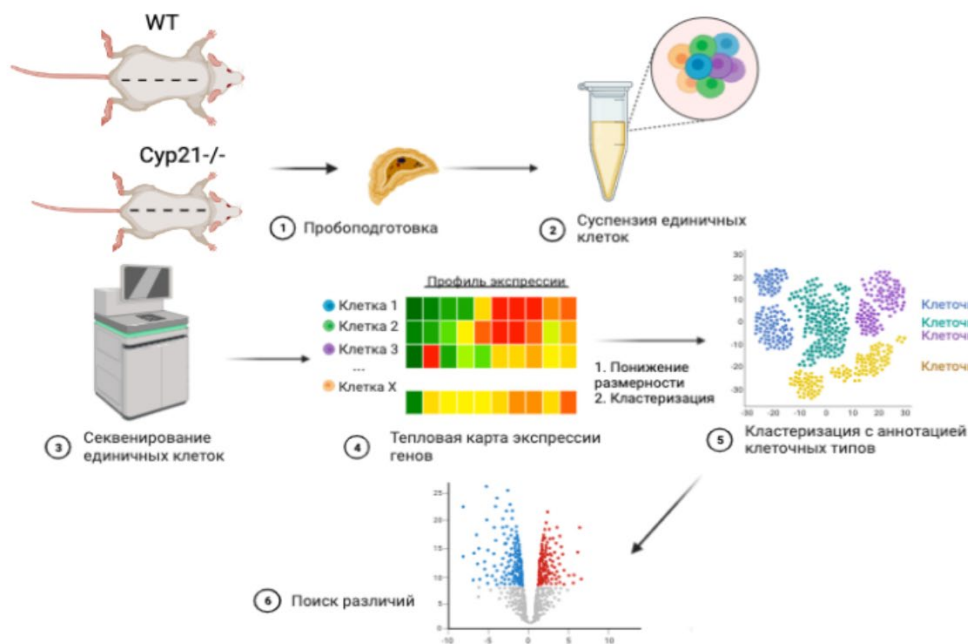


Рис. 1. Дизайн эксперимента

Секвенирование производилось по стандартному протоколу технологии Illumina. В результате были получены данные транскриптома каждой клетки, которые подвергались дальнейшему анализу.

Первичный биоинформатический анализ включал в себя фильтрацию данных с целью выделения клеток высокого качества. Были удалены прочтения без уникального молекулярного идентификатора (UMI), затем строилось распределение клеток по содержанию митохондриальной ДНК. Клетки процентным содержанием митохондриальной ДНК выше среднего от конкретно каждого образца удалялись. Удаление предполагаемых дублетов клеток было произведено согласно алгоритму пакета *scrublet*, основанному на подсчете *scrublet.score*.

Выделение клеток различных транскрипционных профилей в отдельные кластеры

Отфильтрованные данные секвенирования транскриптомов единичных клеток были обработаны с помощью пакета *Seurat v.4* [1]. Все образцы высокого качества были интегрированы, затем была получена финальная кластеризация с аннотацией клеточных типов (рис. 2).

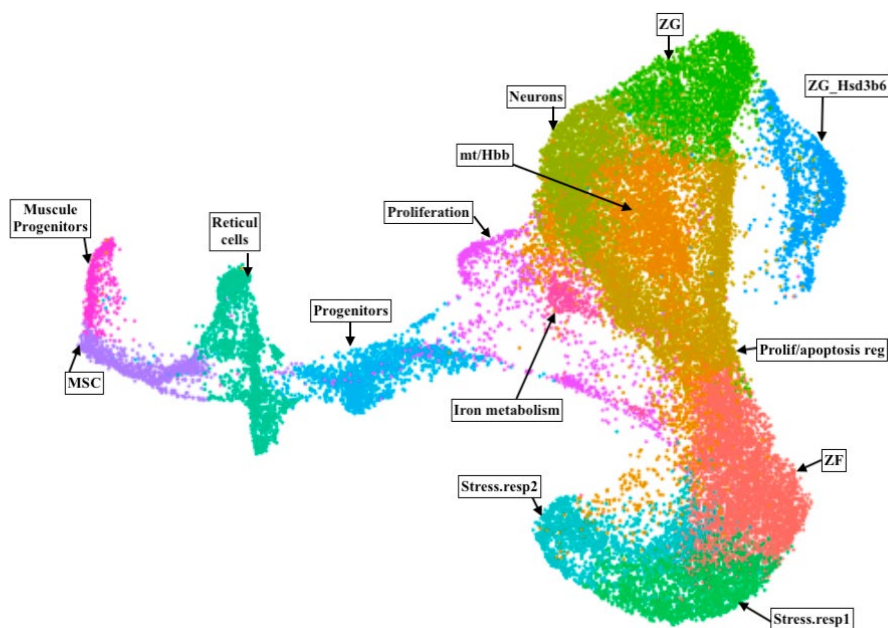


Рис. 2. Субпопуляция адренокортикальных клеток

Характеристика различий транскриптомов единичных клеток надпочечников в норме и патологии

Для поиска различий между двумя состояниями (в нашем случае первое состояние — это надпочечники дикого типа, а второе — при мутации *Cyp21a1*) используется пакет Casoa [2]. Эти два состояния могут различаться по экспрессии (сдвиг экспрессии) или пропорциям (изменение состава) конкретных клеточных популяций. Результаты оценки композиционных различий представлены ниже (рис. 3). Красная линия здесь показывает статистическую значимость ($p < 0,05$). Можно видеть, что клетки zona glomerulosa (ZG), zona fasciculata (ZF), мезенхимальных стволовых клеток значимо перепредставлены в надпочечниках гомозигот. Повышенное количество делящихся клеток может являться отражением гиперплазии органа. Увеличение количества клеток эритроидного ряда можно объяснить увеличенной васкуляризацией гиперплазированной ткани надпочечников больных мышей. Кроме того, ввиду нарушения регуляции кровяного давления и состава крови (из-за нарушения синтеза альдостерона), животные с дефицитом *Cyp21a1* склонны к кровотечениям, что увеличивает примесь эритроидных клеток на этапе приготовления клеточной суспензии. Сдвиги экспрессии между нормой и мутацией в *Cyp21a1* (ось Y) показаны для различных типов клеток (рис. 4).

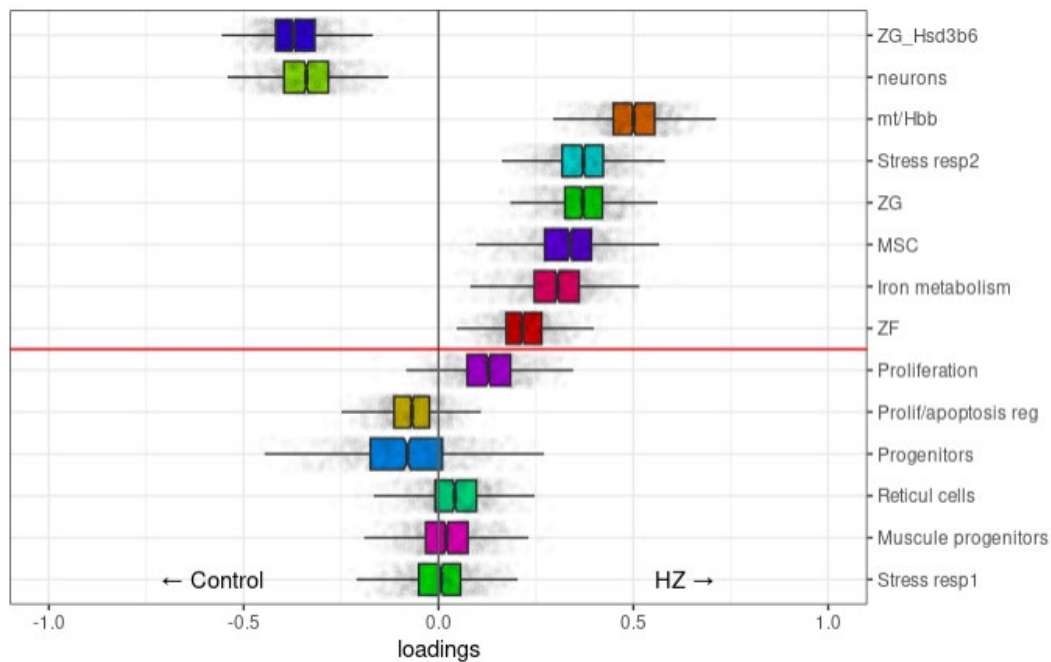


Рис. 3. Композиционные различия

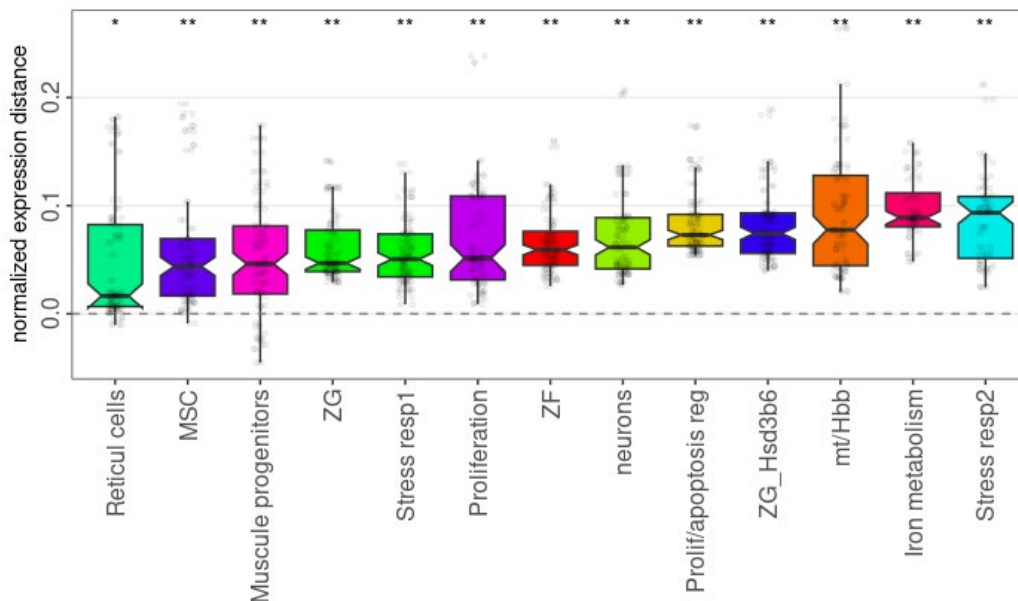


Рис. 4. Транскриптомные различия

Блочные диаграммы представляют собой распределение нормализованных попарных расстояний, где каждое наблюдение представляет сдвиг экспрессии для пары образцов из разных условий. Уровни значимости, оцененные с помощью пермутационного теста, обозначены звездочками сверху. Здесь ось Y показывает величину изменений, а звездочки над столбиками показывают их значимость. Можно наблюдать, что большая часть типов клеток демонстрирует изменения транскрипционных профилей.

Для более детального анализа представлены таблицы генов с наиболее значимой разницей в уровне экспрессии (табл. 1, табл. 2). *Cyp21a1* — ген, кодирующий 21-гидроксилазу, демонстрирует снижение уровня экспрессии у мышей, мутантных по этому гену в сравнении с мышами дикого типа, что характерно для ВДКН. Повышенная экспрессия наблюдается у *Cyp11b2*, кодирующего альдостерон синтазу, которая катализирует терминальную стадию синтеза гормона альдостерона из дезоксикортикостерона. Повышение экспрессии альдостерон синтазы связано с накоплением предшественников синтеза альдостерона, ввиду ограниченности синтеза собственно альдостерона, а также нарушения регуляции кровяного давления и увеличение сигнализации ангиотензинаII. Ввиду нарушения синтеза альдостерона, наблюдается картина изменения экспрессии других генов, связанных с ренин-ангиотен-альдостероновой цепью и генов, регулирующих уровень калия в клетке (*Ren1*, *Slc6a5*) (см. табл. 1)

Таблица 1

Топ-10 генов с значимо вариабельной диф.экспрессией в зоне фасцикулята

Ген	p_value	log2FoldChange
Cyp21a1	4.45E-100	-4.6880353
Cyp11b2	1.34E-70	7.3382662
Slc16a3	8.17E-70	9.9276495
Ren1	2.78E-57	7.2060264
Slc6a5	1.22E-55	5.4649257
Tmem176a	3.58E-42	-2.4315689
Inha	6.12E-42	4.0817635
Clstn3	2.48E-39	4.7161512
Olfm1	1.68E-37	2.6217748
Vps4a	1.51E-31	1.3110063

Таблица 2

Топ-10 генов с пониженной диф.экспрессией в кластере пролиферирующих клеток

Ген	p_value	Log_FC
1500015O10Rik	2.06E-10	-22.1527492
Aes	6.01E-10	-21.5751854
Ly6d	5.39E-25	-12.1573062
Apoe	4.66E-05	-7.8359076
Ifitm3	3.96E-11	-7.6331575
Rasd1	1.52E-05	-6.7162381
Ccn1	1.31E-04	-6.5997274
Shh	4.33E-08	-6.2486212
Rgcc	6.56E-03	-6.1958673
2410015M20Rik	8.45E-02	-6.0141632
Hmgcs2	3.76E-02	-5.7639015
Mgp	1.06E-02	-5.724995
Irf1	2.15E-05	-5.7037548
Cd74	6.34E-02	-5.6349599
2010107E04Rik	1.08E-01	-5.5997768
Sept4	1.04E-06	-5.5816605
Cited1	2.65E-04	-5.5681703
Aldh1a1	9.17E-06	-5.5559694
Crip2	3.66E-03	-5.4694966
Lyz2	3.22E-02	-5.4324414

Анализ транскриптомов клеток надпочечников мышей с дефицитом *Cyp21a1* демонстрирует снижение экспрессии маркеров прогениторов, таких как *Shh* (см. табл. 2). В исследованиях по отслеживанию процессов дифференцировки в мышьяных надпочечниках было показано, что предшественники клеток коры надпочечников рекрутируются из капсульных/субкапсулярных резервуаров посредством передачи сигналов *Shh/Gli1*. Эти клетки мигрируют центростремительно и способствуют обновлению ZG и ZF [3]. Снижение уровня экспрессии данных генов может говорить о повышении величины пролиферации прогениторов и, как следствие, снижении детектируемого количества клеток, находящихся в состоянии предшественников.

В данной работе было проведено секвенирование транскриптомов единичных клеток надпочечников мышей дикого типа и мышей с мутацией гена *Cyp21a1*. Был произведен биоинформатический анализ полученных данных и выявлен ряд значимых отличий в композиции и молекулярной организации органа при патологии. В полученных результатах наблюдается перепредставленность клеток ZF, ZG, мезенхимально стволовых клеток, клеток эритроидного ряда, клеток метаболизма железа и клеток ответа на стресс. Перепредставленность клеток в кластере клеточного цикла может свидетельствовать о повышенной, в сравнении с контролем, пролиферации клеток коры надпочечников. Однако мы не наблюдаем перепредставленности кластера, прогениторов, что могло бы быть следствием повышенной пролиферации и показателем гиперплазии кортикальной ткани. Кластер клеток, находящихся на разной стадии митотического деления, в текущем анализе представляет собой пролиферирующие клетки всех выделенных кластеров, объединение по ключевым маркерам пролиферации (*Top2a* и *Ki67*). По этой причине в текущем эксперименте нет оснований достоверно утверждать причинно-следственную связь между увеличением пролиферативной активности клеток надпочечников и возможной надпочечниковой гиперплазией мышей с дефицитом *Cyp21a1*. Все выдвинутые предположения будут проверены в последующих экспериментах альтернативными методами.

Выводы

На текущий момент ВДКН корректируется пожизненной гормонозаместительной терапией. Такой подход позволяет справляться с жизнеугрожающими состояниями, однако не дает возможности тонко регулировать корректное физиологическое состояние. Таким образом, активно развиваются альтернативные терапевтические подходы, основанные на клеточной и генной терапиях, имеющих потенциал к полному восстановлению естественной функции органа. В свою очередь, эти подходы требуют разработки новых модельных систем, в частности, линий стволовых и прогениторных клеток. Адренкортикальные прогениторы (АКП) происходят из мезодермальных стволовых клеток и далее дифференцируются в стероидогенные клетки надпочечников. Процесс дифференцировки можно воспроизвести *in vitro* помощью активации специфических транскрипционных факторов, следовательно, выявление таких белков, специфичных для АКП, является важной задачей. В результате данной работы были решены поставленные задачи, а именно:

1. Оптимизирован протокол подготовки суспензии единичных клеток надпочечников мышей;
2. Удалось выделить 14 кластеров клеточных типов, в том числе специфический кластер адренкортикальных прогениторов;
3. Были выявлены и описаны значимые различия в транскриптоме клеток коры надпочечников в норме и при мутации *Cyp21a1* как в композиционном анализе, так и по сдвигам экспрессии. Однако, полученные результаты лишь позволяют выдвигать гипотезы и требуют дальнейшей проверки.

Литература

1. Erica Andersen-Nissen William M. Mauck Shiwei Zheng Andrew Butler Maddie J. Lee Aaron J. Wilk Charlotte Darby Michael Zager Paul Hoffman Marlon Stoeckius Efthymia Papalexli Eleni P. Mimitou Jaison Jain Avi Srivastava Tim Stuart Lamar M. Fleming Bertrand Yeung Angela J. Rogers Juliana M. McElrath Catherine A. Blish Raphael Gottardo Peter Smibert Rahul Satija Yuhao Hao. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 2021.
2. Viktor Petukhov, Anna Igoikina, Rasmus Rydbirk, Shenglin Mei, Lars Christoffersen, Konstantin Khodosevich, and Peter V. Kharchenko. Case-control analysis of single-cell rna-seq studies. *bioRxiv*, 2022.
3. Berthon A. Sahut-Barnola I. et al. Drelon, C. Pka inhibits wnt signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun*, 2016.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-327

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА *GUANARITO* НА ОСНОВЕ CRISPR-CAS12A С ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ В ОДНОЙ ПРОБИРКЕ***DEVELOPMENT OF CRISPR-CAS12A BASED DIAGNOSTIC SYSTEM FOR *GUANARITO* VIRUS DETECTION COMBINED WITH ISOTHERMAL AMPLIFICATION IN ONE POT**М. А. Капитонова^{1,2}, А. В. Шабалина¹, В. Г. Дедков¹, А. С. Долгова¹¹Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера²Санкт-Петербургский государственный университетM. A. Kapitonova^{1,2}, A. V. Shabalina¹, V. G. Dedkov¹, A. S. Dolgova¹¹Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg²Saint Petersburg State University

✉ kapitonova.marin@gmail.com

Аннотация

CRISPR-Cas диагностические системы набирают все большую популярность из-за адаптивности, простоты и скорости проведения анализов. В особенности перспектива сочетания ее с изотермической амплификацией открывает новые возможности. В данной работе разрабатывается система детекции вируса *Guanarito*, на основе Cas12a с амплификацией RPA в одной пробирке. После оптимизации параметров системы аналитическая чувствительность составила 10² копий/мкл.

Abstract

CRISPR-Cas based diagnostic systems become more popular due to adaptability, simplicity and rapidness of analyses. In particular, the prospect of combining it with an isothermal amplification opens up new possibilities. In this work, we develop a detection system of the *Guanarito* virus based on Cas12a with RPA amplification in one pot. After several parameters optimization the analytical sensitivity is evaluated as 10² copies/ μ l.

Способность CRISPR-Cas систем, направляемых гидовой РНК (гРНК), специфично определять и расщеплять любую последовательность ДНК нашла широкое применение не только в редактировании геномов, но и в диагностических платформах. Так были разработаны системы молекулярной диагностики DETECTR и HOLMES на основе эффекторного белка Cas12a и SHERLOCK с использованием Cas13 [1]. Отличительной особенностью белков семейств Cas12 и Cas13 является их способность к коллатеральной нуклеазной активности. Она проявляется при связывании Cas в комплексе с гидовой РНК с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. При взаимодействии с целевой дцДНК в белке Cas12 происходят конформационные изменения, проводящие к активации нуклеазной активности в его RuvC домене, где сначала происходят последовательные цис- и транс-расщепление двух цепей целевой дцДНК, а потом и расщепление любых оцДНК (рис. 1) [2]. Если в качестве оцДНК использовать флуоресцентные зонды с флуорофором на одном конце и гасителем на другом, то получится система детекции, реагирующая на присутствие в растворе целевой дцДНК появлением флуоресцентного сигнала от расщепления зондов.

В данной работе исследуется возможность применения LbaCas12a для разработки системы детекции вируса *Guanarito* с изотермической амплификацией в одной пробирке. РНК-содержащий вирус *Guanarito* (GTOV) принадлежит роду *Mammarenavirus*, семейству *Arenaviridae*, относится к I группе патогенности, является возбудителем Венесуэльской геморрагической лихорадки (ВГЛ) [3]. Естественным резервуаром данного вируса являются грызуны *Zygodontomys brevicauda*. Начиная с 1989 года зафиксировано несколько вспышек заболеваний данным вирусом у людей. Летальность ВГЛ оценена в 33,3 %, однако из-за политического и экономического кризиса в Венесуэле в 2006–2021 годах эпидемиологические исследования практически не проводились. На данный момент не существует вакцинации против GTOV, а также эффективного лечения ВГЛ, поэтому для достоверной оценки распространения данного вируса необходима разработка быстрого и простого способа диагностики.

Диагностическая система, представленная в данной работе, основана на платформе DETECTR с использованием изотермической амплификации RPA. В качестве мишени для детекции была выбрана последовательность

* Работа выполнена при поддержке государственной программы Российской Федерации «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации».

фрагмента L-сегмента РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса GTOV, как наиболее консервативный участок. Для данного фрагмента подобраны и оптимизированы RPA праймеры, обеспечивающие наиболее эффективную амплификацию участка длиной в 154 пар оснований. Для него выбраны единые гидовые РНК для LbaCas12a. Выбор участка мишени ограничен необходимостью наличия PAM 5'-TTTN-3' в цепи комплементарной целевой последовательности дцДНК. В качестве флуоресцентного зонда выступил олигонуклеотид с модификациями: 5'-FAM — TTATT — BHQ1-3'.

Cas система протестирована на ДНК-мишенях. В случае наиболее оптимальной гидовой РНК предел чувствительности без амплификации оценен в 10^9 копий/мкл при добавлении 1 мкл ДНК на 25 мкл реакции. Для улучшения чувствительности системы предложено использовать изотермическую амплификацию (RPA) и совмещение ее с детекцией в одной пробирке. Найден наиболее оптимальный способ проведения детекции: 14 мкл смеси RPA добавляется на дно пробирки, а 10 мкл смеси с Cas12a, гидовой РНК и флуоресцентными зондами — на крышку пробирки. Далее к RPA смеси добавляется 1 мкл матрицы, смесь инкубируется 30 минут при температуре +40С для прохождения амплификации. После этого обе смеси в пробирке перемешиваются, и флуоресцентный сигнал регистрируется при +40С при помощи амплификатора реального времени CFX96. Для системы Cas/RPA GTOV после оптимизации чувствительность оценена в 10^2 копий/мкл ДНК-мишени (рис. 2). В дальнейшем планируется добавление шага обратной транскрипции и тестирование системы на РНК.

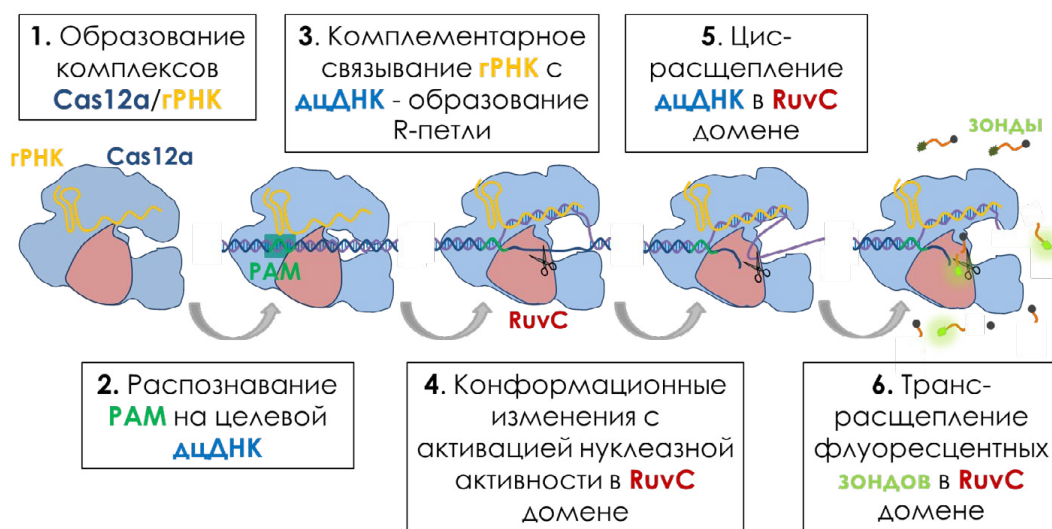


Рис. 1. Схематическое изображение принципа работы Cas-детекции

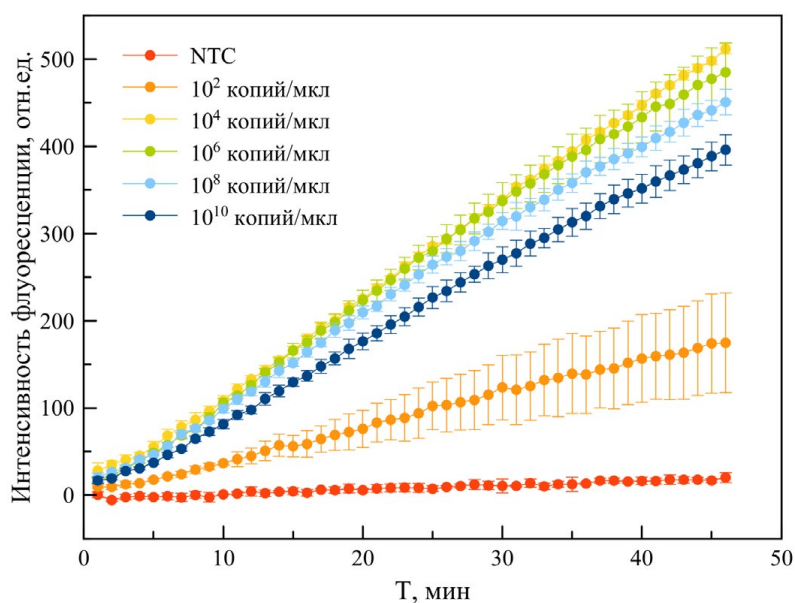


Рис. 2. Усредненный сигнал флуоресценции для системы детекции Cas/RPA GTOV с разной концентрацией ДНК-мишени

Литература

1. Mustafa M.I., Makhawi A.M. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases // *J. Clin. Microbiol.* 2021, V.59 (3), e00745-20.
2. Das A., Goswami H.N., Whymys C.T., Sridhara S., Li H. Structural principles of CRISPR-Cas enzymes used in nucleic acid detection // *Journal of Structural Biology* 2022, 214, 107838.
3. Silva-Ramos C.R., Montoya-Ruiz C., Faccini-Martínez A.A., Rodas J.D. An updated review and current challenges of Guanarito virus infection, Venezuelan hemorrhagic fever // *Archives of Virology* 2022, 167: 1727–1738.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-328

**НОВЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМА
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК-СОДЕРЖАЩЕГО МАММАРЕНАВИРУСА SABIA*****A NOVEL DNAZYME-BASED FLUORESCENT BIOSENSOR FOR DETECTION
OF RNA-CONTAINING SABIA MAMMARENAVIRUS**А. Д. Кириченко¹, Е. А. Брюшкова², А. С. Долгова¹, В. Г. Дедков¹¹Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера²МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологииA. D. Kirichenko¹, E. A. Bryushkova², A. S. Dolgova¹, V. G. Dedkov¹¹Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg²Faculty of Molecular Biology, Lomonosov Moscow State University

✉ kirichenko@pasteurorg.ru

Аннотация

Вирус *Sabia*, вызывающий бразильскую геморрагическую лихорадку (БрГЛ), является малоизученным Аренавирусом. Существующие методы диагностики БрГЛ (ИФА, электронная микроскопия, иммуногистохимия, ОТ-ПЦР) могут быть реализованы только в специализированных лабораториях. Существует потребность в простых, быстрых и точных тест-системах для обнаружения вирусов в полевых условиях, улучшая доступность диагностики и облегчая работу врачей и исследователей.

Abstract

Sabia virus, which causes Brazilian hemorrhagic fever (BHF), is a poorly studied *Arenavirus*. Existing laboratory diagnostic methods for BHF (ELISA, electron microscopy, immunohistochemistry, RT-PCR) require expensive equipment and are labor-intensive. There is a need to develop simple, rapid, and accurate test systems for virus detection in field conditions, improving diagnostic accessibility and facilitating the work of healthcare professionals and researchers.

Бразильская геморрагическая лихорадка (БрГЛ) является наименее изученной нозологической формой из всех аренавирусных геморрагических лихорадок. С 1990 г. по настоящее время было зарегистрировано только 3 случая заболевания у человека, причем 2 из них стали следствием внутрилабораторного заражения. *Sabia* является уникальным членом группы В аренавирусов Нового Света, входящим в комплекс Такарибе, род *Arenavirus*, семейство *Arenaviridae*. Данная группа включает всех возбудителей южноамериканских аренавирусных геморрагических лихорадок: вирусы *Junin*, *Machupo*, *Guanarito*, *Chapare* и *Sabia*, эндемичные очаги которых находятся в сельских районах Аргентины, Боливии, Венесуэлы и Бразилии. Природный резервуар вируса *Sabia* точно не установлен. Есть предположение о том, что возбудитель персистирует в крови грызунов *Akadon azarae*, обитающих в сельских районах Бразилии [1].

Дезоксирибозимы (Dz) представляют собой короткие синтетические ДНК-олигонуклеотиды, катализирующие расщепление фосфодиэфирной связи в присутствии двухвалентных ионов металлов. Для нашей работы был выбран Dz 10-23, поскольку он хорошо изучен и имеет высокую каталитическую активность в отношении любых пар пурин-пиримидин [2]. Биосенсор построен по принципу бинарной пробы [3] и состоит из двух фрагментов (Dz1 и Dz2), формирующих каталитический центр Dz 10-23 и содержащих участки связывания целевой РНК и флуоресцентного субстрата (Fsub) (рис. 1).

Мы предполагали, что частота встречи трех отдельных молекул (РНК, Dz1 и Dz2) в нужной ориентации будет слишком низкой, поэтому разработали два варианта биосенсора: простую бинарную пробу DzSf (рис. 2, Б) и более сложную конструкцию DzS (рис. 2, А).

В структуре DzS дополнительно присутствует цепь T2, выступающая в качестве основной платформы, которой комплементарны цепи T1 и T3, причем Dz1 соединен с участком T2 через гексаэтиленгликолевый линкер. Чтобы исключить возможность сборки каталитического центра Dz 10-23 в отсутствие РНК-мишени, цепь Dz2 добавляется в реакцию в виде свободного олигонуклеотида.

* Работа выполнена в рамках государственной программы "Обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации".

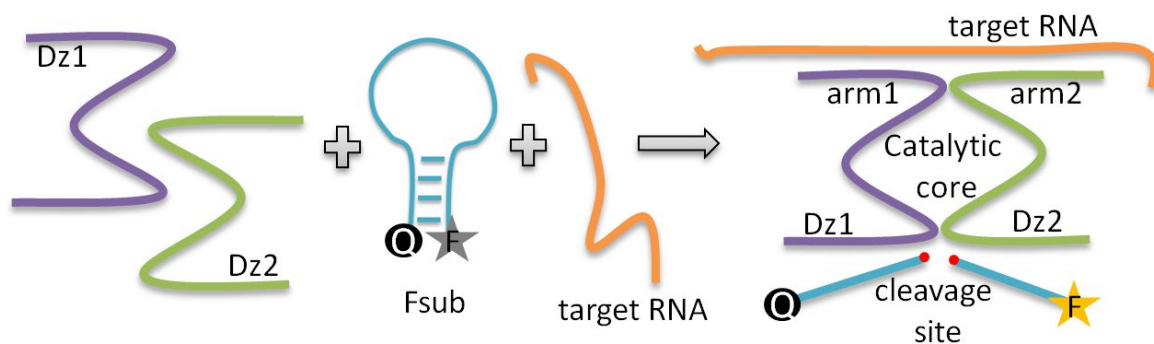


Рис. 1. Схема детекции целевой РНК при помощи бинарной пробы

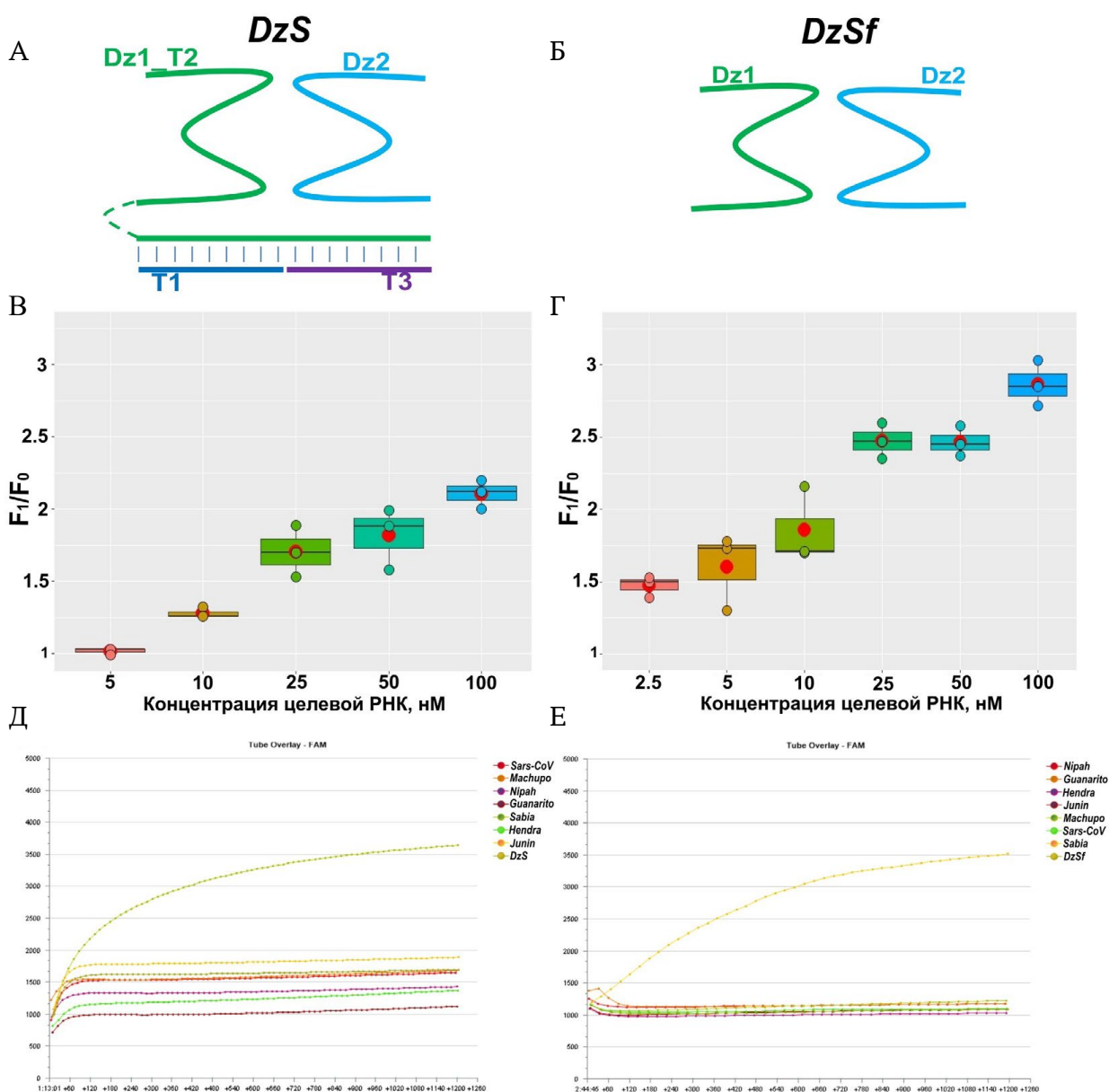


Рис. 2. Сравнение биосенсоров DzS и DzSf. Дизайн биосенсоров DzS (А) и DzSf (Б). Чувствительность DzS (В) и DzSf (Г) представлена в виде отношений F_1/F_0 серии образцов в присутствии целевой синтетической РНК *Sabia* в разной концентрации. За достоверно положительный принимался сигнал от образцов, для которых медиана $F_1/F_0 \geq 1.5$. Оценка специфичности DzS (Д) и DzSf (Е), изображение с флуориметра T16-ISO Instrument Axxin

Биосенсор DzS требует преинкубации в буфере для сборки (5 минут, 95 °C), после чего может храниться при –20 °C в течение нескольких месяцев, DzSf в этом не нуждается, что является преимуществом.

Для оценки диагностического потенциала биосенсоров мы измеряли флуоресценцию FAM в растворе, содержащем фрагмент синтетической РНК вируса *Sabia*, длиной 32 нуклеотида, Fsub и биосенсор (DzS или DzSf). В качестве контроля использовалась смесь соответствующего биосенсора и Fsub.

Для повышения эффективности работы биосенсора мы оптимизировали концентрацию катионов магния (10 mM для DzSf и 25 mM для DzS) и подобрали pH = 7.5.

В этих условиях предел обнаружения целевой РНК достигал 25 нМ для DzS и 5 нМ для DzSf (рис. 2, B, Г), время развития сигнала составляло 20 минут при температуре 37 °C.

Специфичность каждого биосенсора оценивали в присутствии синтетических РНК шести других РНК-вирусов аналогичной длины: *Hendra*, *Machupo*, *Guanarito*, *Junin*, *Nipah* и *SARS-CoV* (рис. 2, Д, Е). Флуоресцентный сигнал был зафиксирован только при добавлении в реакционную смесь РНК *Sabia*.

По итогам нашей работы мы предлагаем модель высокоспецифичного биосенсора DzSf для детекции РНК вируса *Sabia* с пределом чувствительности 5 нМ при 37 °C, не требующий предварительной сборки. В будущем, мы планируем оптимизировать биосенсор DzSf для обнаружения РНК вируса *Sabia* в клинических образцах.

Литература

1. Lisieux T., Coimbra M., Nassar E. S. et al. New arenavirus isolated in Brazil // *Lancet*. 1994. V. 345, N 8894. — P. 391–392.
2. Kirichenko, A., Bryushkova, E., Dedkov, V., Dolgova, A. A Novel DNAzyme-Based Fluorescent Biosensor for Detection of RNA-Containing Nipah Henipavirus // *Biosensors*. 2023. V. 13. P. 252.
3. Kolpashchikov D. M. A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis // *ChemBiochem*. 2007. V. 8. P. 2039–2042.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-329

**СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИНОЙ pVAXRBD
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТРУЙНОЙ ИНЖЕКЦИИ***

**SPECIFIC HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN SYRIAN HAMSTERS IMMUNIZED
WITH pVAXRBD DNA VACCINE USING JET INJECTION**

Л. А. Кисакова¹, Д. Н. Кисаков¹, В. А. Яковлев¹, Е. В. Тигеева¹,
М. Б. Боргоякова¹, К. П. Макарова^{1,2}, А. П. Рудомётов¹, Л. И. Карпенко¹

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

²Тюменский государственный университет

L. A. Kisakova¹, D. N. Kisakov¹, V. A. Yakovlev¹, E. V. Tigeeva¹,
M. B. Borgoyakova¹, K. P. Makarova^{1,2}, A. P. Rudometov¹, L. I. Karpenko¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

²Tyumen State University

✉ orlova.lyub1996@yandex.ru

Аннотация

Проведено изучение гуморального ответа у сирийских хомяков после иммунизации экспериментальной ДНК-вакциной pVAXrbd, кодирующей RBD белка S вируса SARS-CoV-2, введенной с использованием безыгольного инжектора. Показано, что медианные титры специфических к RBD антител в сыворотках иммунизированных животных достигали 1:55050, что подтверждает формирование вируса специфического гуморального иммунного ответа.

Abstract

The research was made of the humoral response in Syrian hamsters after immunization with an experimental DNA vaccine pVAXrbd encoding the RBD of the S protein of the SARS-CoV-2 virus, introduced using a needleless injector. It was shown that the median titers of antibodies specific to RBD in the sera of immunized animals reached 1:55050, which confirms the formation of a virus-specific humoral immune response.

Вспышка пандемии COVID-19 послужила стимулом для разработки широкого спектра вакцин против SARS-CoV-2, в том числе вакцин на основе нуклеиновых кислот, имеющих некоторые преимущества перед традиционными типами вакцин. Основным недостатком разрабатываемых ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность при внутримышечном введении в виде «голой» ДНК. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин был опробован широкий спектр стратегий, включая упаковку в поликатионные полимеры, липосомы, доставку геной пушкой, электропорацию и безыгольную инъекцию.

В данном исследовании был выбран способ введения ДНК-вакцины с помощью безыгольного инжектора, который является достаточно привлекательным методом доставки благодаря простоте применения, эффективности и безопасности.

Ранее в отделе биоинженерии была разработана экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2 и оптимизирован протокол струйной инъекции на модели мышей. Сирийские хомяки являются рекомендованной ВОЗ моделью для изучения COVID-19, поскольку клеточный рецептор ACE2 хомяков обладает высоким сродством к SARS-CoV-2 и животные способны заболеть при инфицировании вирусом.

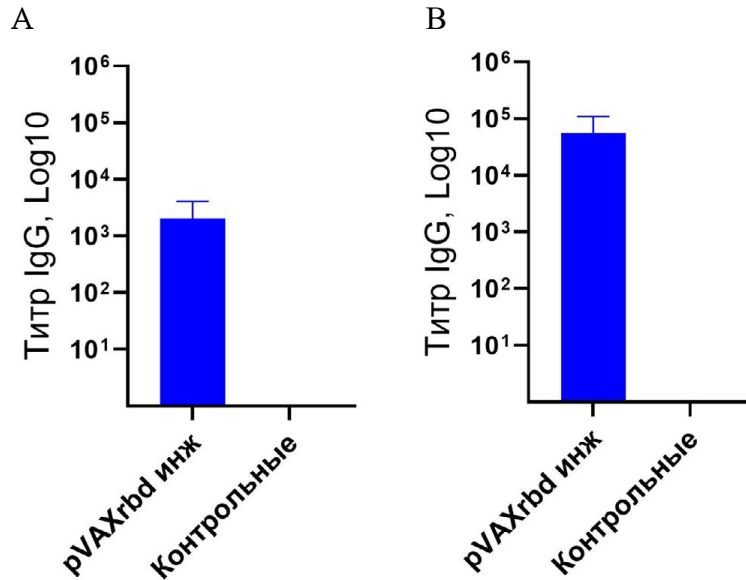
Целью данного исследования было изучение гуморального ответа у сирийских хомяков после иммунизации экспериментальной ДНК-вакциной pVAXrbd, введенной с использованием струйной инъекции.

Для исследования были взяты две группы сирийских хомяков весом 80-100 г. по 6 животных в каждой группе. Было проведено три иммунизации с интервалом 21 день. Иммунизацию проводили в заднюю бедренную мышцу животных методом струйной инъекции, с помощью опытного образца струйного инжектора со следующими характеристиками: скорость потока 220 м/с, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33. Для снижения болевого

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

синдрома применялся ингаляционный наркоз животных с подачей 2,5 % изофлурана. Первой группе вводили плазмиду pVAXrbd в количестве 100 мкг, в 50 мкл физ. раствора, а второй группе животных вводили физ. раствор в том же объёме в качестве контроля. Через 10 дней после второй и третьей иммунизации у животных забирала кровь для получения сыворотки. Гуморальный ответ оценивали по определению RBD-специфических антител в сыворотках животных с помощью ИФА.

В группе хомяков, иммунизированных струйной инъекцией, медианные титры специфических к белку RBD антител достигали 1:2025 после 2-й иммунизации и 1:55050 после 3-й иммунизации (см. рисунок).



Гуморальный ответ у сирийских хомяков после введения pVAXrbd с помощью струйной инъекции:

A — титры специфических антител к RBD SARS-CoV-2 после второй иммунизации; *B* — титры специфических антител к RBD SARS-CoV-2 после третьей иммунизации. Данные представлены как медиана с диапазоном

Таким образом, в ходе данной работы было показано, что введение хомякам экспериментальной ДНК-вакцины pVAXrbd с помощью струйной инъекции обеспечивает формирование вирус специфического гуморального иммунного ответа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-330

СТРЕСС РЕПЛИКАЦИИ ВЫЗЫВАЕТ ЗАДЕРЖКУ ВСТУПЛЕНИЯ В МИТОЗ И ЛОМКОСТЬ ХРОМОСОМЫ 12 В ДЛИННОМ НЕЙРОНАЛЬНОМ ГЕНЕ *ANKS1B* В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**CHROMOSOME 12 FRAGILITY AT THE *ANKS1B* LARGE NEURONAL GENE AND DELAYED MITOTIC ENTRY CAUSED BY REPLICATION STRESS IN HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS**

А. В. Кислова, Д. Жегло, В. О. Пожитнова, Ф. С. Свиридов, Э. П. Гаджиева, Е. С. Воронина

Лаборатория мутагенеза, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

A. V. Kislova, D. Zheglo, V. O. Pozhitnova, P. S. Sviridov, E. P. Gadzhieva, E. S. Voronina

Laboratory of Mutagenesis, Research Centre for Medical Genetics, Moscow

✉ anastasiiakislovav@gmail.com

Аннотация

Для эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека характерен повышенный стресс репликации, способствующий хромосомной нестабильности. Мы охарактеризовали динамику вступления в митоз асинхронных иПСК в условиях стресса репликации и картировали ломкий сайт *FRA12L* в длинном нейрональном гене *ANKS1B*. В нашей работе впервые индуцированы ломкие сайты в иПСК и выявлена хромосомная нестабильность в клинически значимом гене.

Abstract

Replication stress is a feature of embryonic and induced pluripotent stem cells (iPSCs) and predispose to chromosomal instability. We characterized the mitotic entry dynamics of asynchronous iPSCs under the replication stress and mapped the *FRA12L* fragile site in the large neuronal *ANKS1B* gene. Our study provides the first evidence of common fragile site induction in iPSCs and reveals potential somatic instability of a clinically relevant gene.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) применяются для изучения генетических заболеваний и представляют интерес для регенеративной медицины и биологии развития как модель эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Для ЭСК и иПСК характерен высокий уровень стресса репликации, способствующий численной и структурной хромосомной нестабильности, в том числе хромосомы 12, которая несёт на себе гены, отвечающие за регуляцию клеточного цикла и плюрипотентность, а на трисомию по ней приходится примерно 46 % и 30 % случаев анеуплоидии в ЭСК и иПСК человека, соответственно. Наиболее уязвимые к стрессу репликации участки генома получили название конститутивных ломких сайтов (кЛС). Они тканеспецифичны и широко картированы в дифференцированных типах клеток, но не в иПСК.

Для картирования ломких сайтов в дифференцированных клетках моделируют стресс репликации обработкой афидиколином (ингибитором репликативных полимераз). Но оценка генотоксических эффектов как афидиколина, так и других мутагенов, на иПСК затруднена, что можно объяснить характерной для них более эффективной репарацией и низким апоптотическим порогом. Также афидиколин способен замедлять или блокировать клеточный цикл, но точные временные рамки для иПСК ранее не были известны.

Мы охарактеризовали динамику вступления в митоз иПСК в условиях стресса репликации методами проточной цитофлуориметрии и введением 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU), маркера репликации ДНК, одновременно с афидиколином и /или кофеином (ингибирующим комплексы ATR и ATM и ослабляющим G2/M чекпоинт).

Нам удалось выявить задержку клеточного цикла иПСК под влиянием афидиколина (>48 часов), которая превысила используемые в современных работах сроки инкубации 16 и 24 часа, чем можно объяснить существовавшие ранее затруднения в индукции кЛС в иПСК и разночтения в оценке генотоксических эффектов. После оптимизации продолжительности эксперимента с учётом задержки клеточного цикла в иПСК наблюдалась более высокая чувствительность к стрессу репликации по сравнению с первичными лимфоцитами.

Благодаря этому нам удалось добиться стабильной индукции кЛС в иПСК и продолжить работу по картированию наиболее подверженных стрессу репликации участков генома. Используя дифференциальное окрашивание хромосом и последующую локус-специфичную флуоресцентную гибридизацию *in situ* с несерийны-

ми зондами, мы картировали кЛС *FRA12L*, расположенный в большом нейрональном гене *ANKS1B* в бэнде 12q23.1. Эта находка указывает на вклад стресса репликации в возникновение рекуррентной трисомии и aberrаций хромосомы 12. Ген *ANKS1B* чрезвычайно важен для развития мозга в эмбриональном периоде, связанные с ним нарушения проассоциированы с рядом заболеваний, в частности, синдромом гаплонедостаточности гена *ANKS1B*. Таким образом, перестройки в области данного гена в иПСК, риск возникновения которых есть при культивировании *in vitro*, могут сказаться на функциональной состоятельности полученных из иПСК клеток нейрональных линий.

Наша работа позволила впервые добиться стабильной индукции кЛС в иПСК и выявить потенциальную соматическую нестабильность клинически значимого гена в периоде раннего эмбриогенеза и при культивировании клеток *in vitro*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-331

**НОВЫЕ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫЕ ЛАКТОНЫ
КАК ИНДУКТОРЫ ОКСИЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ И БЛОКАТОРЫ
АГРЕССИВНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ***

**NEW SEMISYNTHETIC SESQUITERPENE LACTONES AS INDUCERS OF OXIDATIVE STRESS
IN TUMOR CELLS AND BLOCKERS OF THE AGGRESSIVE PHENOTYPE OF GLIOBLASTOMA
MULTIFORME CELLS**

Д. О. Кичкина^{1,2}, С. С. Патрушев¹⁻³, А. Д. Моралев^{1,2}, Э. Э. Шульц³, М. А. Зенкова¹, А. В. Марков¹

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

²*Новосибирский государственный университет*

³*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

D. O. Kichkina^{1,2}, S. S. Patrushev¹⁻³, A. D. Moralev^{1,2}, E. E. Shults³, M. A. Zenkova¹, A. V. Markov¹

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

²*Novosibirsk State University*

³*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉ daryakichkina@mail.ru

Аннотация

Скрининг противоопухолевого потенциала новых производных изоалантолактона выявил: (1) соединение pat_651p, обладающее высокой селективностью действия в отношении опухолевых клеток и запускающее в них окислительный стресс и апоптоз по митохондриальному пути; (2) соединение pat_651_6p, способное проникать через гемато-энцефалический барьер и эффективно ингибирующее подвижность, инвазионные и адгезивные свойства клеток мультиформной глиобластомы.

Abstract

Screening for the antitumor potency of novel derivatives of isoalanotactone revealed: (1) compound pat_651p, demonstrating high selectivity of action in respect to tumor cells and triggering oxidative stress and mitochondrial-dependent apoptosis in them; (2) compound pat_651_6p capable of passing through the blood-brain barrier and effectively inhibiting the motility, invasion, and adhesive traits of glioblastoma multiforme cells.

Изоалантолактон (ИАЛ) — представитель класса сесквитерпеновые лактоны, обладающий доказанным противоопухолевым потенциалом. Предполагается, что биологическая активность ИАЛ обусловлена наличием α -метилена- γ -лактоновой группы, так как экзоциклическая двойная связь, сопряженная с карбонильной группой, является сильным алкилирующим агентом и вступает в реакции с биологически важными нуклеофилами. Учитывая данный факт, нами была синтезирована библиотека новых производных ИАЛ, несущих различные заместители по двойной связи в положении С-13. Целью настоящего исследования являлась оценка противоопухолевых свойств данных соединений и идентификация лекарственных кандидатов для последующего продвижения их в преклинические испытания.

Скрининг цитотоксичности новых производных ИАЛ на панели опухолевых клеток (клетки глиобластомы U118, рака шейки матки KB-3-1, аденокарциномы молочной железы MCF-7 (человек) и меланомы B16 (мышь)) и нетрансформированных фибробластов человека hFF3 выявил их способность вызывать гибель клеток в микромолярных концентрациях, причем клетки MCF-7 оказались более чувствительными к действию производных ИАЛ по сравнению с другими клеточными линиями. В результате анализа было идентифицировано соединение pat_651p, обладающее наибольшим уровнем цитотоксичности и селективности ($IC_{50}^{(MCF-7)} = 8 \pm 0,1$ мкМ, индекс селективности = 12,5). Исследование его механизма действия на модели клеток MCF-7 показало, что pat_651p вызывает окислительный стресс с последующим снижением митохондриального мембранного потенциала и, как результат, индукцией апоптоза. Блокирование окислительного стресса N-ацетилцистеином (акцептор активных форм кислорода (АФК)) эффективно снижало цитотоксичность pat_651p, что свидетельствует об АФК-зависимой гибели опухолевых клеток под действием лидерного соединения.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-14-00374.

© Д. О. Кичкина, С. С. Патрушев, А. Д. Моралев, Э. Э. Шульц, М. А. Зенкова, А. В. Марков, 2023

В ходе исследований анти-глиобластомного потенциала производных ИАЛ, идентифицировано четыре соединения, потенциально способных проникать через гемато-энцефалический барьер (хемоинформатический анализ с помощью платформ AlzPlatform и PreADMET). Скрининг антиметастатического действия данных производных *in vitro* выявил лидерное соединение pat_651_6p, эффективно ингибирующее в нетоксичных концентрациях подвижность, адгезионные и инвазивные свойства клеток глиобластомы U118.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности использования сесквитерпеновых лактонов в качестве платформы для создания новых противоопухолевых агентов, а соединения pat_651p и pat_651_6p могут рассматриваться в качестве лекарственных кандидатов для терапии рака молочной железы и глиобластомы человека, соответственно.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-332

**ИЗМЕНЕНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ
ПОД ВЛИЯНИЕМ КУРЕНИЯ СИГАРЕТ И ОТКАЗА ОТ НЕГО*****CHANGES IN GUT MICROBIOTA ASSOCIATED WITH SMOKING AND SMOKING CESSATION**А. В. Коваленко, Е. А. Булыгина, А. М. Сенина, М. Н. Синягина,
Д. Р. Хуснутдинова, М. И. Маркелова, С. Р. Абдулхаков, Т. В. Григорьева*Казанский федеральный университет*A. V. Kovalenko, E. A. Boulygina, A. M. Senina, M. N. Siniagina,
D. R. Khusnutdinova, M. I. Markelova, S. R. Abdulkhakov, T. V. Grigoryeva*Kazan Federal University*

✉ annashabot@gmail.com

Аннотация

В работе охарактеризованы изменения состава микробного сообщества кишечника человека под влиянием курения сигарет и отказа от него, при помощи методов секвенирования следующего поколения. Показано, что спустя пять дней после отказа от курения табака состав микробиоты кишечника имеет тенденцию к возвращению к состоянию, не подверженному влиянию курения.

Abstract

This study used next-generation sequencing to characterize changes in the human gut microbiome under the influence of cigarette smoking and smoking cessation. Five days after smoking cessation, the composition of the gut microbiota tends to return to an unaffected state.

Микробиота кишечника человека — сложное микробное сообщество, прямо или косвенно влияющее на все системы органов. Она может изменяться под воздействием диеты, лекарств, возраста, заболеваний и образа жизни.

Курение — одна из наиболее распространенных вредных привычек, наносящая серьезный вред здоровью человека. По данным Всемирной организации здравоохранения, каждый год от последствий курения умирает более 6 миллионов человек [1].

Исследования связывают курение с изменением состава микробиоты кишечника. Механизмы воздействия курения на микробиоту разнообразны и включают в себя иммуносупрессивное воздействие табачного дыма, изменение pH и насыщение кислородом внутренней среды организма [2], а также заселение кишечника бактериями, находящимися на сигаретах [3].

Целью работы являлось охарактеризовать изменения состава микробного сообщества кишечника под влиянием курения сигарет и отказа от него при помощи методов секвенирования следующего поколения.

Исследуемая когорта включала 27 добровольцев обоих полов, курящих сигареты. Средний возраст — $32,8 \pm 10,5$ лет, количество выкуриваемых сигарет до начала исследования — от 10 в день. Исследование проводилось в условиях стационара. В ходе эксперимента образцы кала были отобраны дважды — в начале (точка 0) и через 5 дней (точка 5). Когорта была поделена на 2 группы: участники из первой отказывались от курения после взятия первого образца (14 человек, группы BK0 и BK5), участники из второй продолжали курить (13 человек, группы K0 и K5).

Библиотеки переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Прочтения анализировали с помощью ПО QIIME v. 2 [4] с использованием базы данных SILVA v. 138 [5]. Для выявления значимых отличий в составе микробиоты между группами добровольцев был применен парный тест Вилкоксона, расчеты выполнялись в среде R с помощью RStudio [6].

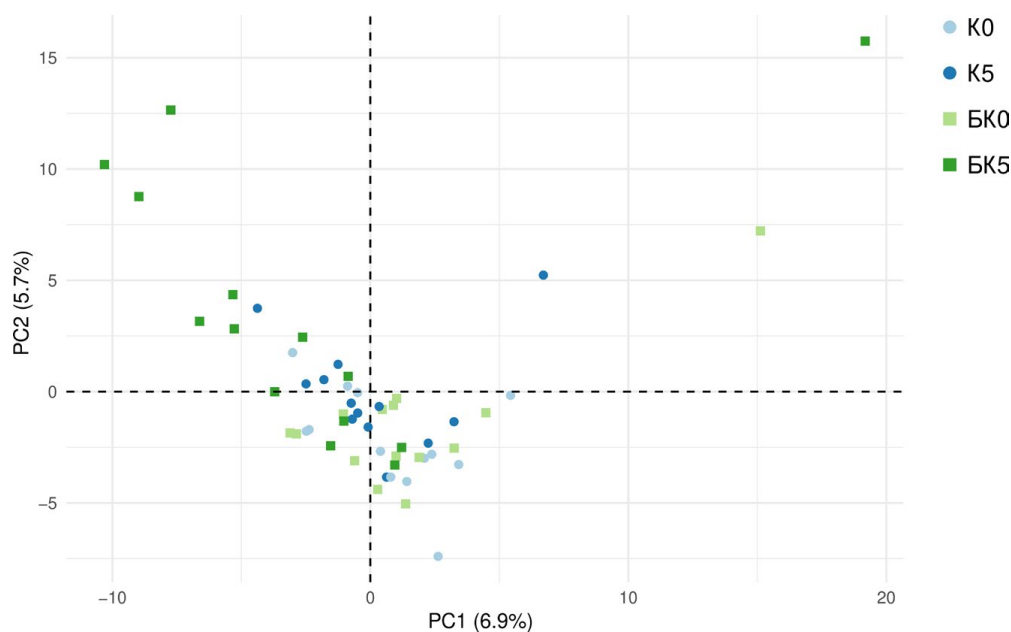
Для образцов были рассчитаны индексы альфа-разнообразия. Значения индекса Шеннона и количество найденных таксономических категорий не отличались между группами.

* 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 (#FZSM-2023-0013).

© А. В. Коваленко, Е. А. Булыгина, А. М. Сенина, М. Н. Синягина, Д. Р. Хуснутдинова, М. И. Маркелова, С. Р. Абдулхаков, Т. В. Григорьева, 2023

В микробиоте кишечника курильщиков и добровольцев, отказавшихся от курения, преобладают одни и те же бактериальные семейства: *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Oscillospiraceae* (суммарная доля около 65 %), и рода: *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Blautia*, *Bifidobacterium* (32 %). Таким образом, по истечении 5 дней после отказа от курения основные представители кишечной микробиоты остаются теми же, но несколько меняется их доля в сообществе.

Анализ бета-разнообразия методом главных компонент (см. рисунок) выявил, что микробиота добровольцев, продолжающих курить, по прошествии времени осталась относительно неизменна (единый кластер K0 и K5), в то время как микробиота бросивших курить на пять суток отличается большим разнообразием (точки BK5 образуют кластер, отдельный от K0 и K5), что может свидетельствовать об изменении доли отдельных представителей микробного сообщества. Так, было обнаружено 19 родов со средней долей в сообществе, равной 1 %, значительно меняющих свою представленность на пять суток после отказа от курения. В частности, снижалась доля родов *Blautia* и *Sutterella*, а доля трех родов семейства *Oscillospiraceae* и одного рода семейства *Christensenellaceae* повышалась, что, согласно литературным данным [7], говорит о возвращении микробиоты содержимого кишечника к состоянию, не подвергнутому влиянию курения табака.



РСА, основанный на представленности бактериальных родов в образцах

Литература

1. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2013: enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. — World Health Organization, 2013.
2. Shanahan E. R., Shah A., Koloski N. et al. Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota // *Microbiome*. 2018. V. 6. P. 150.
3. Sapkota A. R., Berger S., Vogel T. M. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes // *Environ Health Perspect*. 2009. V. 118. P. 351–356.
4. Bolyen E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nature biotechnology*. 2019. V. 37 (8). P. 852–857.
5. Quast C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Research*. 2013. V. 41. P. 590–596.
6. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2018.
7. Lee S. H., Yun Y., Kim S. J. et al. Association between Cigarette Smoking Status and Composition of Gut Microbiota: Population-Based Cross-Sectional Study // *J. Clin. Med*. 2018. V. 7. P. 282.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-333

**АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ
В EX VIVO ТКАНЕВЫХ СРЕЗАХ ПЕЧЕНИ *****ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF MIRNA DELIVERY USING NANOPARTICLES
IN EX VIVO TISSUE SLICES OF THE LIVER**Д. С. Козлов^{1,2}, С. А. Родимова¹, Д. П. Крылов^{1,2}, А. М. Можеров^{1,2}, М. В. Зюзин³, Д. С. Кузнецова^{1,2}¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород²Нижегородский национальный исследовательский
государственный университет им. Н. И. Лобачевского³Университет ИТМО, Санкт-ПетербургD. S. Kozlov^{1,2}, S. A. Rodimova¹, D. P. Krylov^{1,2}, A. M. Mozherov^{1,2}, M. V. Zyuzin³, D. S. Kuznetsova^{1,2}¹Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod³ITMO University, Saint Petersburg

✉ mail-kozlov2015@yandex.ru

Аннотация

Исследование направлено на подбор оптимального носителя для доставки микроРНК. В ходе исследования подобраны микроРНК, нацеленные на инсулиноподобный фактор роста 1. Проанализировано распределение и цитотоксичность нескольких типов наночастиц с использованием модели тканевых эксплантатов печени и мультифотонной микроскопии. Эффективность подавления экспрессии IGF1 оценена с помощью stem-loop PCR, RT-PCR и ИФА.

Abstract

The study is aimed at selecting the optimal carrier for miRNA delivery. In the course of the study, miRNAs targeting insulin-like growth factor 1 were selected. The distribution and cytotoxicity of several types of nanoparticles were analyzed using a model of liver tissue explants and multiphoton microscopy. The efficiency of suppression of IGF1 expression was assessed using stem-loop PCR, RT-PCR and ELISA.

Стимуляция регенерации с помощью биоактивных молекул является многообещающим методом для регенеративной медицины. МикроРНК регулируют до 70 % всех клеточных транскриптов и являются важнейшими регуляторами физиологических процессов, что делает их перспективной мишенью для диагностики и таргетного воздействия при развитии патологии и стимуляции регенерации. Однако доставка микроРНК является сложной задачей, поскольку немодифицированная молекула РНК обладает низкой стабильностью и подвержена действию нуклеаз, а доставка микроРНК в ткани, не являющиеся мишенями, может привести к развитию метаболических нарушений. Таким образом, поиск эффективного метода доставки микроРНК для стимуляции регенерации печени является актуальной задачей, поскольку позволит снизить риск развития печеночной недостаточности после частичной гепатэктомии [1].

Образцы срезов печени были получены с помощью вибрационного микротомы 7000 см³-2 по протоколу Pearen M. A. с соавт. [2]. Для введения наночастиц тканевые эксплантаты инкубировали в течение 3, 24 и 48 часов в среде DMEM с добавлением наночастиц в концентрации 50 и 100 мг/мл. Использовали наночастицы на основе трёх материалов: золото, SiO₂, полилактид (PLA). Наночастицы золота были синтезированы на основе затравочного механизма. Синтез наночастиц SiO₂ осуществлялся золь-гель методом. Наночастицы PLA были синтезированы методом экстракции растворителем в одиночной эмульсии. Средний размер всех наночастиц составлял 100 нм, все наночастицы были модифицированы флуоресцентной меткой Cy5. Срезы печени окрашивали LysoTracker Yellow HCK-123 и Phalloidin FITC. С помощью мультифотонной микроскопии оценивали структуру ткани срезов печени, визуализировали клеточные ультраструктуры, окрашенные флуоресцентными красителями. Распределение наночастиц в ткани печени анализировали с помощью рентгеновской микротомографии. Для этого образцы после фиксации в формалине дегидратировали в восходящих концентрациях спирта, помещали в спиртовой раствор йода на 14-18 часов и отмывали в чистом спирте. Визуализацию проводили на Xradia Versa 520. Используя

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-25-00100.

FLIM, анализировали метаболическое состояние гепатоцитов на основе вкладов времен жизни флуоресценции свободных и связанных форм NADH и NADPH. Поскольку гепатоциты производят большую часть циркулирующего IGF1 [3], для анализа эффективности системы доставки микроРНК с помощью литературного анализа и алгоритмов предсказания мишеней микроРНК (miRDB, TargetScan, TarBase 7.0) были выбраны микроРНК miR-466b-3p, miR-98-5p, miR-29b-3p, нацеленные на 3' нетранслируемую область мРНК IGF1. Трансфекцию с помощью реактива GenJect™-40 (Molecta, Россия) в сочетании с RT-PCR и ИФА использовали для подтверждения эффективности сайленсинга с помощью выбранных микроРНК. Эффективность доставки микроРНК оценивали с помощью методики stem-loop PCR, описанной Chen C. с соавт. [4]. Для корректной нормализации уровня синтетических микроРНК в клетках печени с помощью алгоритмов geNorm и NormFinder была оценена стабильность экспрессии эндогенных коротких РНК, используемых для нормализации экспрессии микроРНК печени (U6, U64, 5S, RNU6B, miR16, let7a).

В результате исследования было выявлено, что наиболее активным накоплением в клетках печени обладают наночастицы полилактида. Накопления наночастиц SiO₂ и золота практически не наблюдалось. Для наночастиц SiO₂ и золота была характерна высокая цитотоксичность. Методом FLIM было показано, что наночастицы полилактида обладают низкой цитотоксичностью и их введение не провоцирует метаболических перестроек, о чём свидетельствует отсутствие значимых отличий относительных вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы NADH и NADPH от контрольных значений. Анализ эффективности подавления экспрессии IGF1 с помощью стандартной трансфекции выбранными микроРНК показал, что выбранные микроРНК обладают достаточной эффективностью сайленсинга для дальнейшего использования в эксперименте. Методом ИФА, RT-PCR и stem-loop PCR было показано, что наночастицы полилактида, несущие микроРНК, способствуют эффективному подавлению экспрессии IGF1 в образцах слайсов печени. Таким образом, наночастицы PLA представляются наиболее перспективными носителями для доставки биоактивных молекул в клетки печени. Полученные результаты станут основой для дальнейшей разработки стратегии стимуляции регенерации печени.

Литература

1. Jin Y., Wang H., Yi K. et al. Applications of Nanobiomaterials in the Therapy and Imaging of Acute Liver Failure // *Nano-Micro Lett.* 2021. Vol. 13, № 1. P. 25.
2. Pearen M.A., Lim H.K., Gratte F.D. et al. Murine Precision-Cut Liver Slices as an Ex Vivo Model of Liver Biology // *JoVE.* 2020. № 157. P. 60992.
3. Jung H.J., Suh Y. Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs // *Front. Genet.* 2015. V. 5. P.472.
4. Chen C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // *Nucleic Acids Research.* 2005. V. 33, № 20. P. e179.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-334

**МИКРОБИОТА РАКА ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА
И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В ПРОГНОЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ*****ORAL CANCER MICROBIOTA IN YOUNG ADULTS AND ITS SIGNIFICANCE IN DISEASE PROGNOSIS**

Е. С. Колегова¹, Л. А. Кононова², И. К. Федорова¹, Д. Е. Кульбакин¹,
И. Ж. Жалсанова³, А. А. Сивцев³, Н. А. Скрябин³, Е. В. Денисов¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии,

Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

²Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск

³Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

E. S. Kolegova¹, L. A. Kononova², I. K. Fedorova¹, D. E. Kulbakin¹,
I. Zh. Zhalsanova³, A. A. Sivtsev³, N. A. Skryabin³, E. V. Denisov¹

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS

²Siberian State Medical University, Tomsk

³Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, RAS

✉elenakolegova@oncology.tomsk.ru

Аннотация

В работе изучены особенности профиля микробиомного сообщества плоскоклеточной карциномы полости рта у пациентов молодого возраста (<45 лет) и его ассоциация с прогрессированием заболевания.

Abstract

This study demonstrates the features of oral squamous cell carcinoma microbiome profile in young adults (<45 years) and its association with disease progression.

Актуальность

Плоскоклеточная карцинома полости рта (ПКПР) является одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем в большинстве развитых стран мира в связи с высокой смертностью (около 40 %) на первом году после постановки диагноза. При этом заболеваемость ПКПР среди пациентов моложе 45 лет растет с каждым годом [1]. Для молодых пациентов с ПКПР характерно агрессивное течение заболевания, малоэффективное применение стандартных схем лечения [2], а также отсутствие классических этиологических факторов, характерных для больных опухолями головы и шеи: употребление табака, алкоголя и инфицирование вирусом папилломы человека [3].

Микроорганизмы являются важным звеном в регуляции метаболизма, иммунной функции и здоровья человека, при этом полость рта является местом обитания более чем 700 видов микроорганизмов и некоторые из них играют ключевую роль в развитии заболеваний полости рта [4]. Однако отсутствуют исследования микробиома ПКПР у пациентов моложе 45 лет.

Цель исследования

Изучить особенности микробиомного сообщества ПКПР у пациентов молодого возраста (≤45 лет) в сравнении с больными старше 45 лет.

Материалы и методы

Сформированы две группы больных РПР (Т2-3N0-2M0) в возрасте до (n=24) и старше 45 лет (n=12), не получавших неoadъювантную химиотерапию. Материалом для исследования явилась опухолевая ткань. ДНК была выделена с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). Далее была проведена амплификация 16S рДНК с использованием пары праймеров 341F и 805R к гипервариабельной области V3-V4 и массовое параллель-

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-1940.2022.3 и использовании оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

© Е. С. Колегова, Л. А. Кононова, И. К. Федорова, Д. Е. Кульбакин, И. Ж. Жалсанова, А. А. Сивцев, Н. А. Скрябин, Е. В. Денисов, 2023

ное секвенирование образцов. Секвенирование проводилось на приборе Miseq (Illumina, США) с использованием набора Miseq V3 Reagents (600 cycles) (Illumina, США). Контроль качества прочтений проводили с использованием FastQC и multiQC, оценка микробных сообществ проведена с использованием программы kraken2 и баз данных по 16S субъединице. Статистическая обработка результатов была выполнена с использованием программы Statistica 10.

Результаты

В результате 16S секвенирования ДНК ткани ПКПР идентифицирован профиль микробиомного сообщества больных моложе и старше 45 лет. Было выявлено увеличение количества сиквенов бактерий рода *Anoxybacillus* и *Granulicatella* в 2,1 и в 2,9 раз, соответственно, в ткани ПКПР молодых пациентов по сравнению с возрастными. В ткани возрастных пациентов было значимо увеличено в 4,0-8,5 раз содержание бактерий рода *Fusobacterium*, *Helcococcus*, *Klebsiella* и *Parvimonas*, а также вида *Propionibacterium acnes* в 3,4 раза. Вид *Streptococcus infantis* встречался только у пациентов с ПКПР моложе 45 лет в 46 % случаев.

Изучена одногодичная общая, безрецидивная и безметастатическая выживаемость 24 молодых пациентов с ПКПР. У 6 человек (25 %) развились рецидивы, у 4 человек (17 %) развились гематогенные метастазы, 5 человек (21 %) умерло в течение одного года после операции. Среди изучаемых микроорганизмов была показана значимая связь количества сиквенов *Collinsella aerofaciens* ($p = 0,028$) в ткани ПКПР с одногодичной безрецидивной выживаемостью пациентов моложе 45 лет; *Anoxybacillus kestanbolensis* ($p=0,042$), *Neisseria cinerea* ($p = 0,019$) — с одногодичной безметастатической выживаемостью пациентов моложе 45 лет; *Staphylococcus sciuri* ($p = 0,030$), *Neisseria subflava* ($p = 0,048$), *Arthrospira fusiformis* ($p = 0,054$), *Loktanella vestfoldensis* ($p = 0,054$) и *Streptococcus infantis* ($p = 0,048$) — с одногодичной общей выживаемостью пациентов моложе 45 лет.

Выводы

Результаты работы демонстрируют специфический профиль микробиомного сообщества ПКПР у пациентов моложе 45 лет, а также связь изменения микробиоты с прогрессией заболевания. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности изучаемых микроорганизмов в процессы опухолевой прогрессии при ПКПР в молодом возрасте и могут послужить основой для разработки новых методов диагностики, прогноза и лечения данного заболевания.

Литература

1. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2020 // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2020. V. 70(1). P. 7-30.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA: a cancer journal for clinicians. 2018. V. 68(6). P. 394-424.
3. Kolegova E. S., Patysheva M. R., Larionova I. V., et al. Early-onset oral cancer as a clinical entity: aetiology and pathogenesis // International journal of oral and maxillofacial surgery. 2022. 51(12). P. 1497-1509.
4. Gholizadeh P., Eslami H., Yousefi M., et al. Role of oral microbiome on oral cancers, a review // Biomed Pharmacother. 2016. V. 84. P.552-558.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-335

ПОЛИМОРФИЗМ C1473G В ГЕНЕ *TRH2* МЫШИ
СНИЖАЕТ СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТА ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ 2

C1473G POLYMORPHISM IN THE MURINE *TRH2* GENE
REDUCES THE STABILITY OF TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 ENZYME

П. Д. Комлева, А. Б. Арефьева, Н. А. Синякова, А. В. Куликов

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

P. D. Komleva, A. B. Arefieva, N. A. Sinyakova, A. V. Kulikov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ polina.komleva@gmail.com

Аннотация

Полиморфизм C1473G вдвое снижает активность ключевого фермента синтеза серотонина в мозге — триптофангидроксилазы 2. В работе показано, что мутация снижает температурную стабильность и увеличивает свободную энергию молекулы фермента, что приводит к снижению его стабильности, числа активных молекул и, в конечном счете, активности мутантной ТПГ2.

Abstract

C1473G polymorphism reduces the activity of tryptophan hydroxylase 2, a key enzyme of serotonin synthesis in the brain. Here we have showed that the C1473G polymorphism decreases temperature stability and free energy of the enzyme resulting in decreasing its stability, the number of active molecule and activity of the mutant TRH2.

Серотониновая (5-НТ) система мозга вовлечена в регуляцию многих физиологических функций и видов поведения. В мозге млекопитающих 5-НТ синтезируется из аминокислоты L-триптофана. Ключевой стадией является гидроксирование L-триптофана до 5-гидрокситриптофана, катализируемая ферментом триптофангидроксилазой 2 (ТПГ2). Активность ТПГ2 определяет уровень 5-НТ в мозге. Полиморфизм C1473G в гене *Trh2*, приводящий к замене Р447R в молекуле ТПГ2, вдвое снижает активность фермента в мозге мышей. Молекулярный механизм, снижающий активность ТПГ2, не ясен.

Целью работы было изучение влияния полиморфизма C1473G на стабильность молекулы ТПГ2. Для этого *in vitro* исследовали температурную стабильность экстрактов ТПГ2 из среднего мозга мышей линий C57BL/6 (1473C, дикий тип) и Balb/c (1473G, мутантный тип). Экстракты фермента прогревали в течении 2 мин при температурах 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60°C и затем активность фермента определяли по скорости синтеза 5-гидрокситриптофана (5-НТР) после инкубации в течении 15 мин при 37°C в присутствии L-триптофана (0.4 мМ) и кофактора 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптеридин (0.3 мМ). Уровень 5-НТР определяли с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектором. Температурную стабильность оценивали по температуре, инкубация при которой активность фермента снижается вдвое (T_{50}).

Было показано, что аллель 1473G снижает величину T_{50} по сравнению с аллелью 1473C (C57BL/6, $T_{50} = 58.8 \pm 0.8$; Balb/c, $T_{50} = 53.5 \pm 0.6$; $F(1,10) = 27.5$, $p < 0.001$).

Важно отметить, что полученные результаты о сниженной стабильности мутантной молекулы ТПГ2 подтверждаются компьютерными расчетами *in silico*. Алгоритмы *muPro* [1], *i-mutant* [2] и SAAFEC-SEQ [3] дают близкие значения увеличения свободной энергии молекулы ТПГ2 в результате замены Р447R, соответственно, 0.96, 1.17 и 1.39 ккал/моль.

Температурная стабильность характеризует общую стабильность молекулы фермента, что отражается на времени ее жизни. Иными словами, молекулы мутантного фермента живут меньше времени и при одинаковой интенсивности экспрессии мутантного фермента и фермента дикого типа, концентрация активных молекул первого будет всегда меньше, чем второго.

Литература

1. J. Cheng J., Randall A., Baldi P. Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines // *Proteins*. 2006. V. 62, N. 4. P. 1125-1132.
2. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure // *Nucleic Acids Res*. 2005. V. 33. N. 2. P. W306-W310.
3. Li G., Panday S. K., Alexov E. SAAFEC-SEQ: A Sequence-Based Method for Predicting the Effect of Single Point Mutations on Protein Thermodynamic Stability // *Int J Mol Sci*. 2021. V. 22. N. 2. P. 606.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-336

**ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ
КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ БЦЖ*****TRANSCRIPTOME ALTERATIONS
IN BONE MARROW CELLS OF BCG-IMMUNIZED MICE**Л. Г. Кондратьева^{1,2}, А. И. Кузьмич¹, И. А. Линге³, Д. А. Дидыч¹, И. В. Алексеенко^{1,2}¹Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва³Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, МоскваL. G. Kondratyeva^{1,2}, A. I. Kuzmich¹, I. A. Linge³, D. A. Didych¹, I. V. Alekseenko^{1,2}¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow²National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow³Central Tuberculosis Research Institute, Moscow

✉ liakondratyeva@yandex.ru

Аннотация

Известно, что использование вакцины БЦЖ способствует увеличению устойчивости к другим заболеваниям и этот эффект связан с обучением клеток врожденного иммунитета. В рамках данной работы, было проведено исследование транскриптомов клеток костного мозга мышей, получивших БЦЖ. Показана вовлеченность дифференциально экспрессирующихся генов во множество иммунных процессов и сигнальных путей.

Abstract

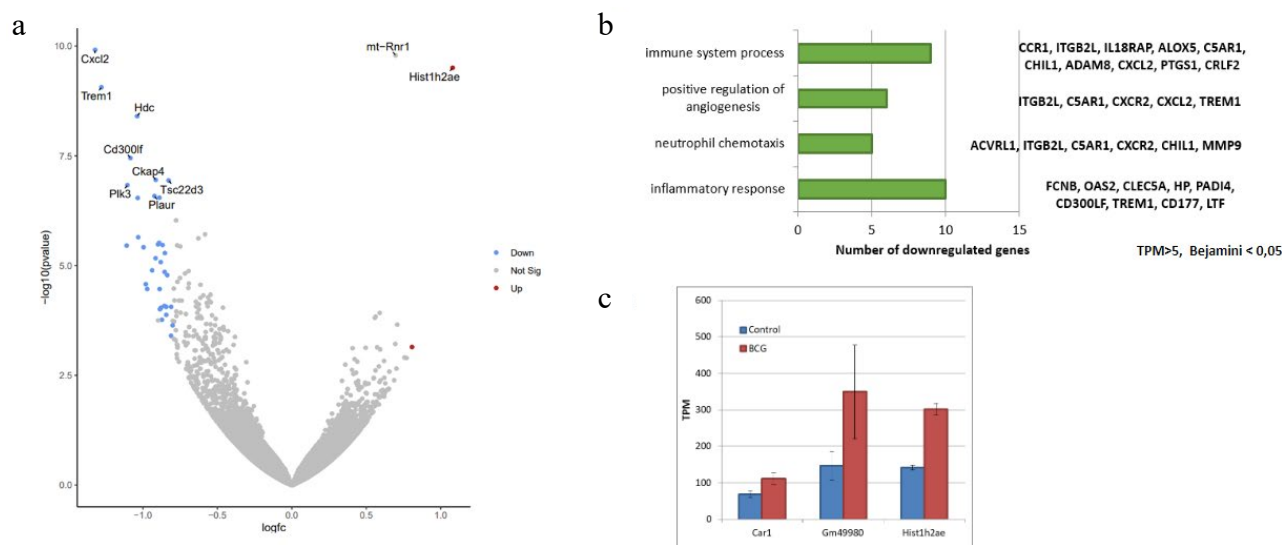
The effect of BCG vaccine is known to enhance resistance to another disease, and this effect is associated with the training of innate immune cells. In the framework of this work, the transcriptomes of bone marrow cells of BCG-treated mice were studied. The involvement of differentially expressed genes in multiple immune processes and signaling pathways was demonstrated.

Феномен «обученного» (trained) иммунитета — это усиление врожденных иммунных ответов после первоначального воздействия, в результате чего амплитуда последующих ответов увеличивается, что можно рассматривать в качестве формы неспецифической иммунологической памяти. Наиболее яркий пример индукции «обученного» иммунитета — действие на организм вакцины БЦЖ, представляющей собой живую аттенуированную вакцину против туберкулеза, которая широко используется в клинической практике в течение 100 лет. Помимо формирования специфического иммунитета против микобактерий БЦЖ также способна индуцировать обучение врожденного иммунитета, сопровождающееся метаболическим и эпигенетическим перепрограммированием клеток врожденного иммунитета (например, макрофагов, моноцитов, дендритных клеток), которое усиливает провоспалительное и противомикробное действие клеток, опосредованное стимуляцией различных внутриклеточных сигнальных путей.

В рамках данной работы было проведено исследование транскриптомов клеток костного мозга мышей через три дня после подкожной инъекции БЦЖ. Мыши линии C57bl были подкожно иммунизированы БЦЖ; через 3, 7 и 14 дней после инъекции с помощью иммуноокрашивания панелью антител и проточной цитометрии было проведено фенотипирование отдельных популяций клеток врожденного иммунитета образцов костного мозга контрольных и вакцинированных БЦЖ мышей. Из собранных образцов клеток костного мозга контрольных и вакцинированных мышей были приготовлены библиотеки кДНК, предназначенные для секвенирования на платформе Illumina. Были получены транскриптомы исследуемых популяций клеток и определены гены с дифференциальной экспрессией после воздействия БЦЖ.

Было обнаружено, что вакцинация мышей БЦЖ приводила к небольшому уменьшению относительного содержания NK клеток в костном мозге через 3 дня после инъекции, а также к небольшому увеличению содержания моноцитов (через 3 и 7 дней после инъекции) и нейтрофилов (через 7 и 14 дней) в костном мозге. Такие изменения сопровождались выраженным увеличением уровня экспрессии отдельных характерных для этих клеток функциональных генов через 3 дня после вакцинации БЦЖ.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00308, <https://rscf.ru/project/22-14-00308/>.
© Л. Г. Кондратьева, А. И. Кузьмич, И. А. Линге, Д. А. Дидыч, И. В. Алексеенко, 2023



a — Volcano диаграмма дифференциально экспрессирующихся генов в клетках костного мозга мышей, вакцинированных БЦЖ, относительно экспрессии генов в костном мозге контрольных мышей. Голубым отмечены гены с пониженной экспрессией, красным — с повышенной, серым — гены, значения которых не изменились; *b* — категории генной онтологии, которыми обогащены найденные даунрегулированные в костном мозге мышей через три дня после введения БЦЖ гены; *c* — экспрессия (в TPM) трех генов с повшенной экспрессией в костном мозге мышей через три дня после введения БЦЖ

Было выявлено 52 гена со сниженным уровнем экспрессии в клетках костного мозга, полученных от вакцинированных БЦЖ мышей, по сравнению с экспрессией в костном мозге контрольных мышей (см. рисунок, *a*). Исследование функционального обогащения с использованием генной онтологии показало (см. рисунок, *b*), что многие из найденных генов ассоциированы с иммунными процессами (CCR1, ITGB2L, IL18RAP, ALOX5, C5AR1, CHIL1, ADAM8, CXCL2, PTGS1, CRLF2), регуляцией ангиогенеза (ITGB2L, C5AR1, CXCR2, CXCL2, TREM1), хемотаксисом нейтрофилов (ACVRL1, ITGB2L, C5AR1, CXCR2, CHIL1, MMP9), воспалительным ответом (FCNB, OAS2, CLEC5A, HP, PADI4, CD300LF, TREM1, CD177, LTF). Согласно анализу сигнальных путей KEGG, отдельные гены вовлечены во взаимодействия цитокинов и цитокиновых рецепторов (CCR1, ACVRL1, IL18RAP, IL1R2, CXCR2, OSM, CXCL2, CRLF2), вирусных белков и цитокинов и цитокиновых рецепторов (CCR1, IL18RAP, CXCR2, CXCL2), сигнальные пути NOD-подобных рецепторов (TRPM2, OAS2, ANTXR2, CXCL2, MAPK13), интерлейкина-17 (MMP9, CXCL2, MAPK13), в формирование внеклеточной ловушки нейтрофилов (ITGB2L, C5AR1, PADI4, MAPK13), систему комплемента и каскады коагуляции (ITGB2L, C5AR1, PLAUR). Было выявлено 3 гена (Car1, Hist1h2ae, Gm49980), увеличивающих свой уровень экспрессии в костном мозге мышей через три дня после вакцинации БЦЖ (рисунок, *c*). Были исследованы уровни экспрессии генов лигандов и рецепторов, экспрессирующихся в клетках костного мозга. Среди ранее обнаруженных генов со сниженным уровнем экспрессии 8 относятся к лигандам, 13 — к рецепторам. Для пары лиганд-рецептор CXCL2-CXCR2 показано снижение экспрессии гена как лиганда, так и рецептора. Таким образом, результаты исследования дополнили фундаментальные представления о механизмах обучения неспецифического иммунного ответа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-337

КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ ВСТРАИВАНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ БЕСКЛЕТОЧНОМ СИНТЕЗЕ*

CO-TRANSLATIONAL FOLDING OF MEMBRANE PROTEINS DURING CELL FREE SYNTHESIS

Ф. Д. Корнилов¹, Е. А. Ананьев², Е. В. Васильева¹, К. С. Минеев¹, С. А. Гончарук¹, М. В. Гончарук¹¹Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва²Московский государственный университет им. М. В. ЛомоносоваF. D. Kornilov¹, E. A. Ananiev², E. V. Vasilieva¹, K. S. Mineev¹, S. A. Goncharuk¹, M. V. Goncharuk¹¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow²Lomonosov Moscow State University

✉ kornilov.fd@gmail.com

Аннотация

Биохимическое получение нативно свернутых мембранных белков (МБ) исключительно важно для развития современной структурной биологии. В работе изучена эффективность ко-трансляционного встраивания МБ в процессе бесклеточного синтеза в различные мембраноподобные среды — липосомы, мицеллы и бицеллы. В качестве объекта исследования выбран ретиновый белок *Exiguobacterium sibiricum* (ESR).

Abstract

The biochemical obtaining of natively folded membrane proteins (MPs) is an extremely important task of modern structural biology. We have studied the efficiency of co-translational incorporation of MPs into various membrane-mimicking media — liposomes, micelles, and bicelles during the cell-free synthesis. The retinal protein of *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) was chosen as an object of study.

Определение принципов работы различных белков на уровне их пространственной структуры является одной из приоритетных задач современной биологии. Подобные знания полезны для рационального дизайна белков с заданными свойствами, а также для таргетной разработки лекарственных препаратов нового поколения. Особый интерес вызывают мембранные белки (МБ), поскольку они задействованы в различных процессах жизнедеятельности клетки. Несмотря на то, что неправильное функционирование МБ нередко приводит к развитию социально значимых заболеваний, на сегодняшний день их структурная организация изучена весьма слабо — в базе данных пространственных структур PDB менее 10 % структур относится к МБ. В первую очередь это связано со сложностями биохимического получения этих объектов, особенно в активном и нативно свернутом состоянии.

Ввиду актуальности разработки новых недорогих методик получения нативно свернутых МБ для структурных исследований, в работе изучена эффективность ко-трансляционного встраивания в процессе бесклеточного синтеза в различные мембраноподобные среды — липосомы, мицеллы и бицеллы. В качестве объекта исследования выбран сенсорный родопсин *Exiguobacterium sibiricum* (ESR), для которого свойственны хорошие выходы при бесклеточном синтезе. По наличию характерного пика поглощения правильно свернутого ESR на длине волны 534 нм удобно оценивать эффективность его фолдинга, в том числе в мембраноподобном окружении. Изучена эффективность накопления растворимого, нерастворимого и активного ESR в присутствии липосом DMPC и мицелл / бицелл, образованных классическими детергентами, такими, как DDM, CHAPS, DHPC. Изучено влияние размера бицелл DMPC/CHAPS и DMPC/DHPC на эффективность накопления ESR, а также опробованы несколько вариантов синтеза — с добавлением различных концентраций детергента в питательную и реакционные смеси. Были выявлены условия, оказывающие минимальное влияние на реакцию бесклеточного синтеза ESR и одновременно способствующие максимальному накоплению активного белка.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-24-00593.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-338

**ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНТРАЦИКЛИН-СОДЕРЖАЩИХ СХЕМ
НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ***

**CHANGES IN THE LANDSCAPE OF BREAST TUMOR UNDER THE ACTION
OF ANTHRACYCLINE-CONTAINING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY REGIMENS**

Е. А. Кравцова, И. А. Цыденова, Д. С. Долгашева,
К. А. Гаптулбарова, Н. В. Литвяков, М. К. Ибрагимова

*Научно-исследовательский институт онкологии —
филиал Томского национального исследовательского медицинского центра РАН*

E. A. Kravtsova, I. A. Tsydenova, D. S. Dolgasheva,
K. A. Gaptulbarova, N. V. Litviakov, M. K. Ibragimova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS

✉ zdereva.e@gmail.com

Аннотация

В структуре онкологической заболеваемости рак молочной железы (РМЖ) занимает ведущее место. При построении тактики лечения РМЖ выбирается комплексный подход, включающий назначение неoadъювантной химиотерапии (НХТ). В этой связи важным является изучение особенностей влияния различных режимов стандартной предоперационной химиотерапии на генетический ландшафт опухоли, определяющей как благоприятный исход, так и стимуляцию метастазирования.

Abstract

Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer morbidity. A comprehensive approach, including the administration of neoadjuvant chemotherapy (NAC), is chosen when constructing a treatment regimen for breast cancer. In this regard, it is important to study the effects of different regimens of standard preoperative chemotherapy on the genetic landscape of the tumour, which determines both the favourable outcome and the stimulation of metastasis.

Введение

На сегодняшний день одними из наиболее эффективных и часто используемых цитостатиков для лечения РМЖ в неoadъювантном режиме являются антрациклин-содержащие препараты. **Целью работы** является изучение изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы при применении антрациклин-содержащих схем НХТ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

Материалы и методы

В исследование включено 35 больных люминальным В HER2- РМЖ IIА–IIIВ стадий. Все пациентки получили 4-8 курсов НХТ по схемам FAC/AC, CAH. Для анализа CNA проводили микроматричный анализ (Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array).

Результаты

Проведен анализ распределения частот CNA в группах пациенток до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования. В исследуемой группе у 13 пациенток (37,1 %) зарегистрировано возникновение гематогенного метастазирования (среднее время $45,7 \pm 0,4$ мес. (min-max: 4-130)).

В результате сравнения частот встречаемости CNA в группе пациенток до лечения показано, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 18q11.2, 18q12.1 и 18q12.2 регионах, в частности у 23,0 % пациенток с наличием гематогенного метастазирования идентифицирована амплификация данных регионов при полном отсутствии амплификаций в них в группе пациенток без гематогенного метастазирования ($p = 0,035$).

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00499.

© Е. А. Кравцова, И. А. Цыденова, Д. С. Долгашева, К. А. Гаптулбарова, Н. В. Литвяков, М. К. Ибрагимова, 2023

При сравнении частот встречаемости CNA после лечения выяснили, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в 9p22.2 регионе (0 % до лечения / 38,5 % после НХТ) ($p=0,00229$). Также установлено, что возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве делеций в 9p21.3 регионе (0 % до лечения / 23,1 % после НХТ) ($p = 0,053$). Потенциально данные локусы могут выступать в качестве прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования у больных люминальным В подтипом РМЖ при назначении антрациклин-содержащих схем НХТ.

Вывод

Выявлены потенциальные прогностические маркеры возникновения гематогенного метастазирования для люминального В HER2- РМЖ при применении антрациклин-содержащих схем в режиме НХТ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-339

**ЦИТОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ
НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА *****CYTOSTATIC EFFECT OF COLD PLASMA JET
ON HUMAN TUMOR CELLS**Н. В. Крячкова¹⁻³, А. А. Полякова¹⁻³, М. М. Бирюков¹⁻³,
Е. В. Милахина³, Д. Э. Закревский³, И. В. Швейгер³, О. А. Коваль¹⁻³¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*³*Институт теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН, Новосибирск*N. V. Kryachkova¹⁻³, A. A. Polyakova¹⁻³, M. M. Biryukov¹⁻³, E. V. Milakhina³,
D. E. Zakrevsky³, I. V. Schweigert³, O. A. Koval¹⁻³¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*³*Khrstianovich Institute of Theoretical and Applied Mechanics SB RAS, Novosibirsk*

✉ krychkovanv@rambler.ru

Аннотация

Холодная плазма активирует различные процессы при действии на биомолекулы, включая опухолевые новообразования. В потоке струи холодной плазмы (ХПС) образуются активные формы кислорода и азота, вызывающие окислительный стресс. В данном исследовании показано увеличение образования активных форм азота в облученных опухолевых клетках A549 по сравнению с здоровыми клетками Wi-38. Действие ХПС на опухолевые клетки вызывает остановку клеточного цикла и подавляет их пролиферацию.

Abstract

Cold plasma activates various processes when acting on biomolecules, including tumors. Cold plasma jet (CPJ) generates active forms of oxygen and nitrogen, and such species cause oxidative stress. This study shows an increase in active forms of nitrogen in irradiated A549 tumor cells compared to healthy Wi-38 cells. The action of CPJ on tumor cells causes cell cycle arrest, and suppresses their proliferation.

За последние десятилетия онкологические заболевания стали одной из главных причин смерти во всем мире, в связи с этим разработка новых эффективных терапевтических стратегий имеет высокую социальную значимость.

Холодная плазменная струя (ХПС) атмосферного давления — это частично ионизированный газ или смесь газов, поток которых содержит большое количество реакционноспособных частиц, ионов, электронов, и т.д. При взаимодействии ХПС с биологическими мишенями температура в области взаимодействия не превышает 40 °С, что позволяет воздействовать на них без термических повреждений.

Среди генерируемых плазмой АФКА наибольший интерес вызывает роль активных форм азота, а именно образование и действие оксида азота (NO) и его производных на жизнеспособность онкотрансформированных клеток. Известно, что низкая концентрация NO в опухолевых клетках индуцирует рост и пролиферацию клеток, тогда как высокие уровни, наоборот, способствует гибели по пути апоптоза. При попадании в жидкую среду оксид азота может превращаться в ионы нитритов (NO₂⁻) и нитратов (NO₃⁻), которые влияют на клетки, вызывая длительный стресс, приводящий к остановке клеточного цикла и к гибели. В связи с этим, сравнение активных форм азота при обработке здоровых и опухолевых клеток является актуальной задачей.

Целью данного исследования являлось изучение цитостатического эффекта ХПС на опухолевые клетки легкого человека A549 и здоровые клетки фибробластов легкого человека Wi-38.

Исследование жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ-анализа после обработки. Было показано, что снижение жизнеспособности прямо пропорционально времени воздействия ХПС на клетки. Исследование пролиферации обработанных ХПС клеток в режиме реального времени с помощью клеточного анализатора iCELLigence показало, что обработка клеток A549 длительностью 1 минуту супрессировала деление

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-19-00255-П; 22-49-08003.

© Н. В. Крячкова, А. А. Полякова, М. М. Бирюков, Е. В. Милахина, Д. Э. Закревский, И. В. Швейгер, О. А. Коваль, 2023

клеток. Для подтверждения влияния ХПС на клеточный цикл облученные клетки анализировали методом проточной цитометрии с использованием пропидия йодида. Результаты проточной цитометрии показали сосредоточение облученных клеток в фазе G2/M.

Определение содержания нитрит-ионов в ХПС-обработанных клетках проводили методом Грисса. Более продолжительная обработка клеток вела к большему содержанию нитрит-ионов, что хорошо согласуется с данными по жизнеспособности клеток.

Можно заключить, что обработка опухолевых клеток холодной плазменной струей приводит к накоплению в среде активных форм азота, оказывающих цитостатический эффект, инициирующий остановку клеточного цикла и их гибель.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-340

**ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИЙ ГЕНА *TOOTHTRIN******GENERATION OF GENETICALLY MODIFIED *DROSOPHILA MELANOGASTER*
FOR THE STUDYING OF *TOOTHTRIN* GENE FUNCTIONS**

Е. Е. Куваева, И. Б. Мерцалов, О. Б. Симонова

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва

E. E. Kuvayeva, I. B. Mertsalov, O. B. Simonova

Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow

✉ lена_kuv@mail.ru

Аннотация

Ген *toothrin* (*tth*) относится к эволюционно консервативному семейству генов *d4*. В отличие от других D4-белков ТТН имеет только один из трёх характерных для семейства доменов — домен 2/3. Так как функции *tth* неизвестны, мы получили *tth*-нокаутных и трансгенных *tth-Gal4* дрозофил для исследования его ноль-мутантов и паттерна экспрессии. Наши результаты свидетельствуют об участии *tth* в развитии и функционировании нервной, зрительной и эндокринной системы.

Abstract

toothrin (*tth*) belongs to the evolutionarily conserved *d4* gene family. In contrast to other D4 proteins, TTH contains the only one of three family-specific conserved domains, the 2/3 domain. Since the functions of *tth* are unknown, we generated both *tth*-knock-out and *tth-Gal4* transgenic flies to study its null-mutants and expression pattern. Our results indicate the involvement of *tth* in the development and functioning of the nervous, visual and endocrine systems.

Семейство генов *d4* (или *Dpf* — *Double PHD Fingers*) млекопитающих представлено тремя генами. Два из них, *neuro-d4/Dpf1* и *Cer-d4/Dpf3*, нейроспецифические, и их экспрессия регулируется в развитии [1, 2]. Другой ген, *ubi-d4/Requiem/Dpf2*, экспрессируется убиквитарно и на одинаковом уровне на всех стадиях развития [3]. Белки этого семейства обладают общим планом строения, включающим набор доменов: N-концевой домен 2/3 (*Requiem*), центральный цинковый палец Кгүрпель-типа и C-концевой домен, состоящий из двух тандемно расположенных «цинковых пальцев» PHD — типа, или D4-домен.

В результате альтернативного сплайсинга ген *Cer-d4* образует две изоформы: полноразмерную (DPF3b) и без домена D4 (DPF3a). Ген *Cer-d4* экспрессируется в сердечной и скелетной мышцах [4], а также в мозжечке, половых железах, а его транскрипт, кодирующий DPF3a, — в сетчатке глаза [3]. Подобные изоформы есть также у беспозвоночных животных, у которых семейство генов *d4* представлено одним геном. У двукрылых насекомых обнаружено 2 гена семейства *d4*, у дрозофилы это гены *drosophila-d4* [5] и *toothrin* (*tth*). Белковый продукт гена *tth*, подобно изоформе DPF3a, не имеет D4-домена, и его функции остаются неизвестными.

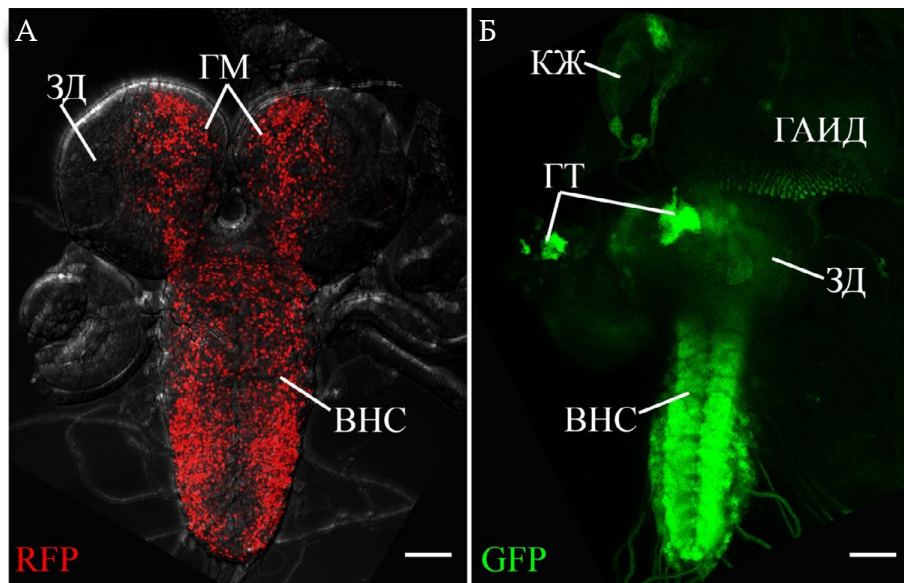
С целью выяснения функции *tth* мы провели его нокаут методом направленной гомологичной рекомбинации [6]. Для этого локус гена *tth* заменили мутантной копией, содержащей маркерный ген *mini-white*. Нокаут *tth* не вызвал видимых фенотипических нарушений у имаго. Однако мы обнаружили летальных эмбрионов с нарушением развития головы. Поскольку гены семейства *d4* нейроспецифические, мы визуализировали нервную систему *tth*-нокаутных дрозофил. Для этого путём генетических скрещиваний в геном мутантов внесли драйверную конструкцию *Elav-Gal4*, экспрессирующую фактор GAL4 под промотором паннейронального маркера *Elav*, и репортерную конструкцию *UAS-CD8-GFP*, экспрессирующую GFP под контролем индуцибельного промотора *UAS*. Используя принцип двухкомпонентной системы Gal4/UAS [7], мы активировали внесенные конструкции и проанализировали морфологию нервной системы эмбрионов с нулевой мутацией *tth*. В результате мы обнаружили недоразвитие зачатка головного мозга, в частности зачатка его оптической доли, наряду с нарушениями развития периферической нервной системы.

Для изучения картины специфической экспрессии *tth* мы внесли последовательность транскрипционного фактора *Gal4* непосредственно после стартового кодона *tth*. Для этого с помощью метода рекомбинирования в бак-

* Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н. К. Кольцова РАН, в рамках выполнения ГЗ ИБР РАН № 0088-2021-0007.

териальную искусственную хромосому несущую локус гена *tth*, полученную из библиотеки VASRAC resources (<https://vasracresources.org>), встраивали короткую кассету, содержащую последовательность фактора *Gal4*. Конструкцию инъецировали в эмбрионы мух. Таким образом, была получена линия дрозофил *tth-Gal4*, где *Gal4* находился под промотором *tth*.

Для анализа экспрессии *tth-Gal4* мы использовали мух двух репортерных линий, одна из которых экспрессирует GFP в мембранах, другая — RFP в ядрах клеток. Это позволило установить паттерн экспрессии гена *tth* в нейронах головного мозга личинки, зрительной доли, грибовидных телах, а также фоторецепторных клетках глазо-антенного имагинального диска, нейронах вентрального нервного ствола и клетках нейросекреторного органа, эквивалентного нейроэндокринной гипоталамо-гипофизарной системе позвоночных животных — кольцевой железе, а именно в кардиальных (*corpora cardiaca*) и прилежащих (*corpora allata*) телах (см. рисунок).



Паттерн экспрессии у личинок *tth-Gal4*: А — генотип личинки *tth>RFP:nls*; Б — генотип личинки *tth>CD8-GFP*.

Представлены серии оптических срезов органов личинки с прижизненной визуализацией, снятые на конфокальном микроскопе Zeiss LSM880. Обозначения: ВНС — вентральный нервный ствол, ГАИД — глазо-антенный имагинальный диск, ГМ — головной мозг, ГТ — грибовидное тело, ЗД — зрительная доля, КЖ — кольцевая железа. Масштабная полоса: 50 мкм

Помимо представленного на рисунке 1 паттерна, ТТН экспрессируется в хордотональных и хемосенсорных органах личинки.

Таким образом, по нашим предварительным данным, ген *tth* участвует в развитии центральной и периферической нервной системы, в частности, зрительных органов, а также в функционировании органов нейросекреции, контролирующей гормональную регуляцию развития *D. melanogaster*. Особенности доменной организации продукта *tth* и паттерн его экспрессии говорят о том, что он может выполнять ту же роль, что и изоформы DPF3а у млекопитающих. Созданные линии мух будут полезны для изучения неизвестных функций подобных изоформ у позвоночных животных и человека в условиях *in vivo*.

Литература

1. Gabig T. G., Mantel P. L., Rosli R., et al. Requiem: a novel zinc finger gene essential for apoptosis in myeloid cells // J Biol Chem. 1994. V. 269(47). P. 29515-9.
2. Ninkina N. N., Mertsalov I. B., Kulikova D. A., et al. Cerd4, third member of the d4 gene family: expression and organization of genomic locus // Mamm Genome. 2001. V. 12(11). P. 862-6.
3. Mertsalov I. B., Kulikova D. A., Alimova-Kost M. V., et al. Structure and expression of two members of the d4 gene family in mouse // Mamm Genome. 2000. V. 11(1). P. 72-4.
4. Lange M., Kaynak B., Forster U. B., et al. Regulation of muscle development by DPf3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex // Genes Dev. 2008. V. 22(17). P. 2370-84.
5. Nabirochkina E., Simonova O. B., Mertsalov I. B., et al. Expression pattern of *dd4*, a sole member of the *d4* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster* // Mech Dev. 2002. V. 114(1-2). P. 119-23.
6. Куваева Е. Е., Куликова Д. А., Симонова О. Б. и др. Получение нулевой мутации гена *toothrin* методом направленной гомологичной рекомбинации у *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2023. Т. 54(3). Стр. 232-8.
7. Brand A. H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. V. 118(2). P. 401-15.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-341

ОТ ОМИКС-ТЕХНОЛОГИЙ ДО ВЫДЕЛЕНИЯ НОВОГО БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА AMI *LYSOBACTER CAPSICI* XL1, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ*

OMICS FOLLOWED BY THE ISOLATION OF NEW BACTERIOLYTIC ENZYME AMI OF *LYSOBACTER CAPSICI* XL1, PROMISING FOR THE DESIGN OF NEW GENERATION ANTIMICROBIALS BASED ON IT

И. В. Кудрякова¹, А. С. Афошин¹, С. В. Тарлачков¹, Е. А. Леонтьевская¹,
И. Е. Галемина^{1,2}, Д. В. Зеленов^{1,2}, Н. В. Леонтьевская¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино

²Пушчинский филиал Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ)

I. V. Kudryakova¹, A. S. Afoshin¹, S. V. Tarlachkov¹, E. A. Leontyevskaya¹,
I. E. Galemina^{1,2}, D. V. Zelenov^{1,2}, N. V. Leontyevskaya¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino

²Pushchino Branch of Russian Biotechnological University (BIOTECH University)

✉ kudryakovairina@yandex.ru

Аннотация

В данной работе с использованием омикс-технологий был обнаружен ген бактериолитического фермента Ami *L. capsici* XL1. Была разработана гомологичная система экспрессии на основе штамма *L. capsici* IAEN. В результате очистки из культуральной жидкости экспрессионного штамма получена бактериолитическая амидаза Ami и изучены физико-химические свойства, включая субстратную специфичность.

Abstract

In this study, the gene of bacteriolytic enzyme Ami of *L. capsici* XL1 was identified using omics. The homologous expression system was developed based on *L. capsici* IAEN. As a result of purification from culture liquid of expression strain, bacteriolytic amidase Ami was obtained. The physicochemicals properties of Ami, including substrate specificity, was studied.

Проблема распространения множественно-устойчивых к антибиотикам микроорганизмов стоит в современной биомедицине остро как никогда. В связи с этим поиск альтернативных биологически активных соединений является особенно важной задачей. Среди известных литически активных соединений особый интерес представляют бактериолитические ферменты, разрушающие основной компонент клеточных стенок бактерий — пептидогликан, и не вызывающие развития механизмов резистентности к ним.

В ИБФМ РАН изучаются бактерии рода *Lysobacter*, некоторые представители которого являются мощными продуцентами литических агентов, включая бактериолитические ферменты. Одним из таких перспективных продуцентов является штамм *L. capsici* XL1 (ранее *Lysobacter* sp. XL1). Из культуральной жидкости этой бактерии получают высокоэффективный антимикробный препарат для наружного применения лизоамидазу. Антимикробная активность лизоамидазы обусловлена действием бактериолитических ферментов. На данный момент их выделено и идентифицировано пять (Л1-Л5). В настоящее время ведется разработка высокоэффективных антимикробных препаратов, в том числе для внутреннего применения, отвечающих современным запросам биомедицины и ветеринарии. Все это обуславливает поиск новых активных бактериолитических ферментов и подбор оптимальных их соотношений в качестве активной субстанции. Целью данной работы являлся поиск бактериолитического фермента *L. capsici* XL1 с использованием современного подхода — омикс-технологии.

Для поиска генов предполагаемых перспективных бактериолитических ферментов было проведено исследование дифференциальной экспрессии генов *L. capsici* XL1 на платформе Illumina HiSeq 4000 при культивировании в оптимальных условиях продукции бактериолитических ферментов. В качестве референсного штамма был использован штамм *L. capsici* XL2 (не обладает бактериолитической активностью), который культивировали в идентичных условиях. В ходе работы было получено количество прочтений, позволяющее провести подсчет

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (проект № МК-1864.2022.1.4).

дифференциальной экспрессии генов. В результате был обнаружен целый пул генов, увеличивших свою экспрессию, среди которых были как уже известные нам бактериолитические ферменты, так и неизученные ранее гидролитические ферменты. Также был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов *L. capsici* XL1, полученных из внеклеточных белков штамма, с последующей идентификацией белков LC-MS/MS. Полученные результаты были сопоставлены с данными транскриптомного исследования, что позволило идентифицировать истинно внеклеточные бактериолитические ферменты. Для данной работы был отобран ген N-ацетилмурамоил-L-амидазы *ami* (увеличение уровня экспрессии в 325 раз).

Был сконструирован экспрессионный вектор pBBR1-P_{GroEL(A)}-*ami* (экспрессия гена *ami* под контролем модифицированного промотора GroEL *L. enzymogenes*). Был получен штамм *L. capsici* IAEN-Ami, экспрессирующий ген *ami*, в котором отключен ген ключевого фермента *blp*. Была разработана схема очистки бактериолитической амидазы Ami до электрофоретически гомогенного вида с использованием методов колоночной хроматографии: катионообменная хроматография на колонках с носителем Toyopearl CM-650 и EnrichS с последующей очисткой на гель-фильтрационной колонке HiLoad 16/60 с использованием хроматографической системы NGC.

Были определены оптимальные условия гидролиза бактериолитической амидазы в отношении автоклавированных клеток *Micrococcus luteus* Ac-2230^T: 5–10 мМ Трис-HCl, pH 8.0 при 60 °С. Была изучена субстратная специфичность бактериолитической амидазы Ami в отношении белковых субстратов, автоклавированных и живых клеток бактерий при 37 °С. Оказалось, что фермент активно гидролизует автоклавированные клетки *Micrococcus luteus* Ac-2230^T (36 063 ЛЕ/мг), *Bacillus cereus* 217 (2 873 ЛЕ/мг), *Proteus vulgaris* H-19 (5 206 ЛЕ/мг), *Escherichia coli* K-12 (44 000 ЛЕ/мг), *Staphylococcus aureus* 209P (453 ЛЕ/мг) и живые клетки бактерий *M. luteus* Ac-2230^T (815 ЛЕ/мг), *B. cereus* 217 (4 524 ЛЕ/мг), *S. aureus* 209P (18 ЛЕ/мг), *B. thuringiensis* VKM-83 (1 079 ЛЕ/мг) и *B. megaterium* MS941 (3 000 ЛЕ/мг) с высокой эффективностью. Дальнейшая работа будет нацелена на разработку антимикробных препаратов на основе бактериолитической амидазы Ami *L. capsici* XL1.

Таким образом, применение омикс-технологий позволило найти, выделить и охарактеризовать бактериолитический фермент Ami *L. capsici* XL1, перспективный для разработки антимикробных препаратов нового поколения, нацеленных на борьбу с супербактериями.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-342

**ОСОБЕННОСТИ ГЛУТАТИОНОВОЙ РЕДОКС-СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ,
ПЕРЕНЕСШИХ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ****FEATURES OF THE GLUTATHIONE REDOX SYSTEM
IN PATIENTS AFTER CORONAVIRUS INFECTION**

Д. Б. Куликова, В. О. Носова, А. А. Тищенко

Академия биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского ЮФУ, Ростов-на-Дону

D. B. Kulikova, V. O. Nosova, A. A. Tishchenko

Academy of Biology and Biotechnology named after D. I. Ivanovsky, SFedU, Rostov-on-Don

✉ darya.kulikova1316@gmail.com

Аннотация

COVID-19 включает в себя широкий спектр клинических признаков и симптомов, варьирующих от бессимптомных инфекций до острого респираторного дистресса. Глутатионовая редокс-система, представленная в организме человека ферментами глутатион-S-трансферазой (GST), глутатионпероксидазой (ГПО) и глутатионредуктазой (ГР), осуществляет антиоксидантную защиту клеток. Окислительный стресс играет немаловажную роль в протекании коронавирусной инфекции, поэтому оценка состояния глутатионовой редокс-системы позволяет сделать выводы о наличии и выраженности окислительного стресса у больных пациентов. Кроме того, исследования антиоксидантной роли глутатионовой редокс-системы в защите клеток от оксидативного стресса имеют перспективу в разработке и внедрении различных фармацевтических продуктов.

Abstract

COVID-19 includes a wide range of clinical signs and symptoms ranging from asymptomatic infections to acute respiratory distress. The glutathione redox system, represented in the human body by the enzymes glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPO), and glutathione reductase (GR), provides antioxidant protection for cells. Oxidative stress plays a significant role in the course of coronavirus infection, therefore, an assessment of the state of the glutathione redox system allows us to draw conclusions about the presence and severity of oxidative stress in sick patients. In addition, studies of the antioxidant role of the glutathione redox system in protecting cells from oxidative stress have a perspective in the development and implementation of various pharmaceutical products.

Фермент глутатионпероксидаза представлен семейством селенсодержащих ферментов, катализирующих восстановление пероксида водорода или органических пероксидов до воды или, соответственно, спиртов. В качестве донора электронов при этом используется восстановленная форма глутатиона [1,2].

Глутатион S-трансфераза образует суперсемейство изоформ, катализирующих конъюгацию глутатиона с рядом неполярных соединений, содержащих электрофильные атомы углерода, серы, азота и фосфора [3–6]. В семействе GST выделяют три группы изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные.

Глутатионредуктаза занимает ключевую роль в восстановлении дисульфидов и процессах деглутатионирования. Изоформы Grx — термостойчивые низкомолекулярные белки, функционирующие как GSH-зависимые оксидоредуктазы, относящиеся по структуре к суперсемейству тиоредоксинов и играющие важную роль в клеточных редокс-зависимых процессах [7].

Активность ГПО оценивалась по количеству израсходованного глутатиона. SH-группы глутатиона взаимодействуют с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБК, реактив Элмана), в результате чего образуется цветной продукт-тионитрофенильный анион (ТНФА), концентрация образовавшегося ТНФА определялась колориметрически до и после инкубации.

Оценка активности ГР проводилась по степени окисления НАДФ*Н, что сопровождалось снижением оптической плотности при $\lambda = 340$ нм.

Определение конъюгирующей способности GST основывалось на оценке скорости реакции ферментативного образования GS-2,4-динитробензола при взаимодействии восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ), образующийся конъюгат обладает максимумом поглощения при $\lambda = 340$.

В ходе исследования было сформировано 3 испытуемые группы переболевших коронавирусной инфекцией по 3 усредненным признакам: группа без учета возраста (учитывались лишь пол и тяжесть заболевания),

группа без учета половой принадлежности (учитывались лишь возраст и тяжесть заболевания), группа без учета тяжести перенесенного заболевания (учитывались возраст и половая принадлежность испытуемых). Обработка полученных статистических данных осуществлялась с помощью пакета программ «STATISTICA — 10.0». Для выявления статистически значимых различий между исследуемыми группами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни, поскольку мы имели дело с ненормальным распределением. Результаты были представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

Было выявлено, что активность фермента ГПО в плазме крови пациентов разных возрастов, степени тяжести и пола, переболевших коронавирусом ожидаемо снижается. Активность фермента ГР в плазме крови пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию снижается больше у мужчин, чем у женщин, а у пациентов с тяжелой формой активность данного фермента снижается сильнее, чем у пациентов, перенесших болезнь в легкой форме. Активность обоих ферментов в плазме крови больных, перенесших коронавирусную инфекцию, снижается с возрастом. Из этого следует, что глутатион является ключевым компонентом для оптимального функционирования антиоксидантной системы, а его дефицит может привести к разного рода нарушениям в функционировании тканей и органов. Изучение активности GST продемонстрировало, что во всех испытуемых группах, по сравнению с контрольной, достоверных различий обнаружено не было.

Тем не менее, исследования ферментов глутатионовой редокс-системы продолжаются и нацелены на дальнейшее более тщательное изучение их роли в окислительном стрессе, что позволит более полно оценить антиоксидантный статус у пациентов с посткоронавирусными явлениями.

Литература

1. Cheng, S.B. Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection / H. T. Liu, S. Y. Chen, P. T. Lin // *Journal Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. V. 12, I. 1. P. 1213–1220.
2. Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions / H. Sies // *Free Radical Biology and Medicine*. 2019. V. 27, I. 10. С. 916–921.
3. Wu, B., and Dong, D. (2012) Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery, *Trends in Pharmacological Sciences*, 33, 656–668.
4. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88
5. Tew, K.D., and Townsend, D.M. (2012) Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death, *Antioxidants & Redox Signaling*, 17, 1728-1737
6. Кулинский, В.И. (1999) Обезвреживание ксенобиотиков, *Соросовский образовательный журнал*, 1, 8–12.
7. Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (2009) Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins, *BMC Evolutionary Biology*, 9, artical 66.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-343

МЕТАТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ЖЕЛУДКА У БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ***METATRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF THE BACTERIAL COMPOSITION OF DIFFERENT PARTS OF THE STOMACH IN PATIENTS WITH GI TRACT DISEASES**

Е. А. Куприянова, С. Р. Абдулхаков, М. И. Маркелова, Т. В. Григорьева

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет

E. A. Kupriyanova, S. R. Abdulkhakov, M. I. Markelova, T. V. Grigoryeva

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ fewrandomletters@gmail.com

Аннотация

Считается, что микробиота желудка играет важную роль в прогрессировании воспаления и патогенезе заболеваний верхних отделов ЖКТ. Однако на сегодняшний день проблема остается малоизученной. Целью данного исследования было охарактеризовать микробиоту слизистой оболочки желудка у *H. pylori*-позитивных и *H. pylori*-негативных пациентов в биоптатах из антрального отдела и тела желудка.

Abstract

Gastric microbiota is supposed to play an important role in progression of inflammation and pathogenesis of upper GI disorders. However, to this date the issue remains poorly understood. The aim of this study was to characterize the microbiota of the gastric mucosa in *H. pylori*-positive and *H. pylori*-negative patients in biopsy samples from the antrum and corpus of the stomach.

Принято считать, что микрофлора человека играет важную роль в поддержании здоровья хозяина, участвуя в широком спектре метаболических функций и в нормальной работе иммунной системы [1]. На сегодняшний день существует лишь небольшое количество исследований, посвященных изучению представителей желудочной микробиоты, помимо *H. pylori*, которые могут играть важную роль в возникновении заболеваний верхних отделов ЖКТ. При исследовании микрофлоры желудка биоптат обычно берут из антрального отдела, однако микробный состав разных отделов желудка может существенно различаться. Целью данного исследования было охарактеризовать микробиоту слизистой оболочки желудка у *H. pylori*-положительных и *H. pylori*-отрицательных пациентов в образцах биопсии из антрального отдела и тела желудка.

Было получено 72 парных образцов биопсии слизистой оболочки желудка (один образец из антрального отдела и один из тела желудка, соответственно) от 36 пациентов, прошедших процедуру ЭГДС в связи с подозрением на какое-либо заболевание гастродуоденальной области. По данным уреазного экспресс-теста в сочетании с результатами цитологического исследования выявлено 13 *H. pylori*-положительных и 23 *H. pylori*-отрицательных больных. Суммарную РНК из каждого образца экстрагировали реагентом TRIzol. Фракция РНК затем использовалась для синтеза кДНК. Библиотеки ампликонов варибельной области V3-V4 гена 16S рРНК секвенировали на платформе Illumina MiSeq.

Существует значительная разница в бактериальном составе между *H. pylori*-положительными и *H. pylori*-отрицательными образцами. *H. pylori*-положительные пациенты показали доминирование рода *Helicobacter*. Также имеется заметная разница между бактериальным составом антрального отдела и тела желудка, что особенно важно для *H. pylori*-позитивных пациентов. Например, количество представителей рода *Helicobacter* в отдельных образцах кДНК составило 25, 35 и 36 % при исследовании антрального отдела желудка и 87, 81 и 72 % в теле желудка соответственно, что ставит под сомнение рациональность взятия биопсия только из антрального отдела для подтверждения диагноза инфекции *H. pylori*. Помимо *H. pylori*, среди образцов наблюдалось преобладание *Streptococcus*, *Prevotella*, *Clostridiales* и *Enterobacteriaceae*, а также присутствие родов *Rothia*, *Gemellaceae*, *Fusobacterium* и *Neisseria*, которые обычно признаются нормальной желудочной микробиотой [2]. Бактерии родов *Lautropia*, *Enhydrobacter*, *Rikenellaceae*, *Acinetobacter*, *Leptotrichia* и *Carnocytophaga* были обнаружены в малом количестве, поэтому, вероятно, представляют собой незначительную, малоизученную часть микробиоты желудка.

* В рамках выполнения проекта № FZSM-2023-0013 государственного задания КФУ.

© Е. А. Куприянова, С. Р. Абдулхаков, М. И. Маркелова, Т. В. Григорьева, 2023

Исходя из полученных данных, можно сделать предположения, что *H.pylori* имеет тенденцию преобладать в желудке *H.pylori*-положительных пациентов, особенно при анализе тела желудка по сравнению с антральным отделом. Использование биопсии тела желудка, вероятно, имеет большую прогностическую ценность при диагностике инфекции *H. pylori*. Также, использование кДНК, по сравнению с классическими методом на основе ДНК, для подготовки библиотек генов 16S рРНК позволяет выявлять большее разнообразие родов бактерий.

Литература

1. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R (2018) Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* 24(4):392–400.
2. Schulz C, Schutte K, Koch N, Vilchez-Vargas R, Wos-Oxley ML, Oxley APA, Vital M, Malfertheiner P, Pieper DH (2018) The active bacterial assemblages of the upper GI tract in individuals with and without *Helicobacter* infection. *Gut* 67 (2):216–225.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-344

**ОЦЕНКА УРОВНЯ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ CD34+ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
МЫШАМ ЛИНИИ NBSGW МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР**

**ESTIMATION OF DONOR CHIMERISM AFTER TRANSPLANTATION OF HUMAN CD34+
HEMATOPOIETIC STEM CELLS TO NBSGW MICE BY DIGITAL DROPLET PCR**

В. О. Лаушкина¹, А. И. Шакирова¹, Я. В. Комарова¹, А. Р. Муслимов^{1,2},
А. В. Онопченко², Е. В. Щелина², С. А. Острова², М. Г. Васютина², К. В. Лепик¹

¹НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Санкт-Петербург

²НМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

V. O. Laushkina¹, A. I. Shakirova¹, Y. V. Komarova¹, A. R. Muslimov^{1,2},
A. V. Onopchenko², E. V. Shchelina², S. A. Ostrova², M. G. Vasutina², K. V. Lepik¹

¹R. M. Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Saint Petersburg

²V. A. Almazov National Medical Research Center
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg

✉ valeriia.laushkina@gmail.com

Аннотация

В доклинических исследованиях существует проблема оценки донорского химеризма при приживлении CD34+ клеток человека в экспериментальных животных. С помощью цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) можно добиться более точных результатов в сравнении с рутинно применяемой проточной цитофлуориметрией. Целью исследования была разработка протокола определения уровня химеризма методом цкПЦР в костном мозге мышей линии NBSGW.

Abstract

In preclinical studies, there is a problem of estimating donor chimerism in animal models engrafted with human CD34+ cells. Using digital droplet PCR (ddPCR) more accurate results can be achieved in comparison with routine flow cytometry. The aim of the study was to develop a protocol for determining the level of chimerism by ddPCR in the bone marrow of NBSGW mice.

Введение

В доклинической практике для оценки уровня приживления гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) человека у мышей рутинно применяется проточная цитофлуориметрия (ПЦ). Однако, данный метод имеет ряд недостатков, таких как невозможность подсчета абсолютного количества клеток, неточность при оценке низких значений химеризма [1], необходимость добавления реагента, блокирующего мышинный FcR при стандартном протоколе окрашивания. Помимо этого существует проблема ограниченного срока хранения биологического материала для анализа цитофлуориметрическим методом. Цифровая капельная ПЦР (цкПЦР) является альтернативным способом оценки приживления, компенсирующим недостатки ПЦ.

Целью исследования была разработка протокола цкПЦР для определения уровня химеризма в костном мозге (КМ) после трансплантации CD34+ гемопоэтических стволовых клеток человека мышам линии NBSGW.

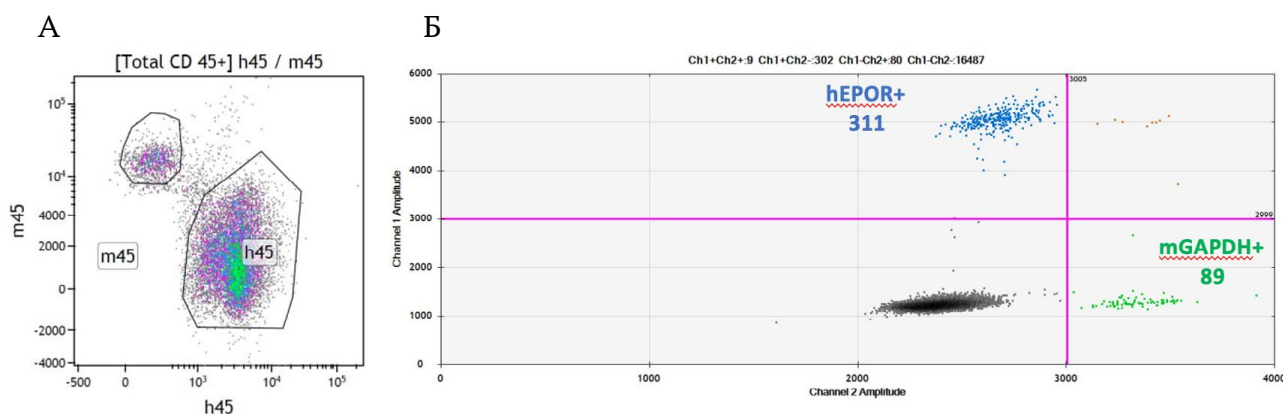
Материалы и методы

В исследование было взято 9 мышей линии NOD.B6.SCID Il2γ^{-/-}KitW41/W41 (NBSGW) с медианой возраста 3–4 недели. Данная линия поддерживает приживление ГСК человека без предварительного облучения, что обеспечивает достижение у них высокого уровня донорского химеризма. Животных содержали в условиях SPF вивария барьерного типа на базе ЦДТИ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», где также осуществляли процедуры трансплантации, наблюдения и отбора биоматериала. Все манипуляции проводили с использованием протоколов, одобренных Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC). В день трансплантации Д0 животным было произведено внутривенное введение первичных CD34+ ГСК здорового донора

* В. О. Лаушкина, А. И. Шакирова, Я. В. Комарова, А. Р. Муслимов, А. В. Онопченко, Е. В. Щелина, С. А. Острова, М. Г. Васютина, К. В. Лепик, 2023

в количестве 1×10^6 .

На Д+140 животные были выведены из эксперимента. Образцы КМ отбирали для выделения ДНК с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells (Евроген) в соответствии с протоколом от производителя. Постановку цкПЦП осуществляли на приборе QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США) с использованием реагентов ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad, США). Для постановки реакции были подобраны праймеры и зонды на мышинный ген *mGAPDH* и на человеческий ген рецептора эритропоэтина — *hEPOR*. Уровень химеризма рассчитывали как долю капель с позитивным сигналом *hEPOR* от суммы всех аллелей *mGAPDH* и *hEPOR* в реакции. Полученные данные сравнивали с результатами ПЦ тех же образцов КМ, но окрашенных прижизненно комбинацией флуоресцентно меченых антител против поверхностных антигенов клеток человека (h) и мыши (m): hCD45/mCD45/DRAQ-7. Примеры оценки приживления трансплантата ГСК человека в костном мозге мышей методами ПЦ и цкПЦП представлены на рисунке.



Пример оценки уровня донорского химеризма у мышей линии NBSGW методами ПЦ (А) и цкПЦП (Б)

Результаты

Согласно полученным данным цкПЦП, среднее значение уровня химеризма клеток человека в КМ к дню Д+140 после трансплантации составило $61,3 \pm 22$ % (от 25,1 % до 84,7 %). В тех же образцах КМ по данным ПЦ уровни химеризма, определенные как доля hCD45+ клеток от суммы CD45+ клеток человека и мыши, варьировали от 23,5 до 93,6 % ($63,3 \pm 26$ %). Расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена показал наличие весьма высокой степени тесноты связи между сравниваемыми группами значений цкПЦП и ПЦ ($r = 0,967$; $p < 0,0001$). Методом серийных разведений ДНК, выделенной из образцов костного мозга мышей исследуемой группы после трансплантации было показано, что чувствительность метода цкПЦП достигает 0,03 %.

Выводы

Разработан протокол цифровой капельной ПЦП для определения уровня химеризма в костном мозге (КМ) после трансплантации CD34+ гемопоэтических стволовых клеток человека мышам линии NBSGW. Потенциально метод будет полезен при уточнении данных уровня химеризма, определенного методом ПЦ, в том числе в образцах с долей клеток человека менее 1 %.

Литература

1. Suchy F.P. et al. Streamlined and quantitative detection of chimerism using digital PCR //Scientific Reports. 2022. Т. 12. № 1. С. 10223.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-345

**АКТИВНОСТЬ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ОТНОШЕНИИ
ГЕТЕРОТИПИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ 3D-МОДЕЛЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*****THE ACTIVITY OF HUMAN NK CELLS TOWARDS HETEROTYPIC CELLULAR
3D MODEL OF BREAST CANCER**А. А. Леонтьева^{1,2}, М. М. Абдурахманова¹, А. А. Юрина^{1,3},
С. В. Кулемзин³, В. А. Рихтер¹, Е. В. Кулигина¹, А. А. Нуштаева¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университет³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, НовосибирскA. A. Leonteva^{1,2}, M. M. Abdurakhmanova¹, A. A. Urina^{1,3},
S. V. Kulemzin³, V. A. Richter¹, E. V. Kuligina¹, A. A. Nushtaeva¹¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University³Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

✉ a.leonteva2@g.nsu.ru

Аннотация

Для разработки новых методов терапии рака молочной железы (РМЖ) необходима физиологически релевантная модель, отражающая гетерогенность опухоли. Перспективными клеточными моделями являются 3D-модели, состоящие из гистологически различных популяций клеток. В данной работе разрабатываются клеточные модели и подходы к их формированию, а также оценивается влияние ИЛ-15 или TGFβ на инфильтрацию НК-клеток в 3D-модели и их киллерную активность.

Abstract

More advanced cellular models that adequately reflect the heterogeneity of the breast cancer (BC) should foster the development of new treatments. Heterotypic spheroid (3D) models that consist of histologically distinct cell populations can mimic heterogeneity of BC. In this work, we selected the conditions for the formation of such models, and evaluated the effect of IL-15 and TGFβ cytokines on the infiltration and killer activity of NK cells in a 3D model.

В рамках исследования реализованы подходы, позволяющие формировать сфероидные 3D-модели из клеток опухолевых линий MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3, моделирующих три молекулярных типа РМЖ, и стромальных клеток BN120f, BrC120f и BrC4f, имитирующих три типа стромальных клеток (нормальные, опухолевые и опухоль-ассоциированные фибробласты), в режимах: 1) моно-культивирования (3D), при котором сфероид формируется из одного типа клеток, 2) со-культивирования (3D-2) опухолевых и стромальных клеток с использованием природных гидрогелей и низкоадгезионного пластика. Для формирования 3D-моделей из фибробластов (3Df) больше подходит субстрат из 2 %-агарозы, из опухолевых клеток (3De) — Matrigel™ или низкоадгезивный пластик Nunclon™ Sphera™; для культивирования 3D-2 предпочтительнее применение планшета Nunclon™ Sphera™. Для реализации гетеротипической 3D (3D-3) модели сначала формировали 3D-2 и на 5 сутки культивирования добавляли НК-клетки. В качестве иммунных клеток использовали линию НК-подобных клеток УТ (УТ) или НК, полученные из периферической крови человека (PB-NK).

Для оценки жизнеспособности клеток в составе трехмерных моделей использовали диацетат флуоресцеина (FDA), окрашивающий живые клетки, и йодистый пропидий (PI), окрашивающий некротические клетки. Для 3De на 10 день культивирования в центре сфероидов наблюдается небольшое число PI⁺ клеток. Для 3Df и 3D-2 характерно формирование некротического ядра в центре сфероида на 10 день культивирования вне зависимости от типа фибробластов.

Предпосылкой инфильтрации и проявления киллерной активности НК в 3D-3 моделях является разрушение структуры сфероидов. MDA-MB-231 проявляют высокую чувствительность к цитотоксическому действию УТ в 2D-, 3D- и 3D-3-модели. Показано, что именно фибробласты привлекают УТ внутрь гетеротипических сфе-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-74-10039.

роидов, усиливая их цитотоксическую активность. В случае 3Df большая часть НК-клеток не проникает в сфероиды и не разрушает их.

В научной литературе показано, что ИЛ-2 необходим для активации функций РВ-НК *in vitro*, поэтому далее мы оценили комбинированный подход иммунотерапии с дополнительной стимуляцией РВ-НК цитокинами ИЛ-15 (активирующей) или TGF β (ингибирующей) на 5 сутки совместного культивирования.

Для 3De и 3D-2 из MCF-7 комбинация ИЛ-15+РВ-НК обуславливает уменьшение размера сфероида и значительное снижение процента FDA⁺-клеток. TGF β стимулирует киллерную активность РВ-НК в случае 3D-2 с опухолевыми (BrC120f) и здоровыми (BN120f), но не с опухоль-ассоциированными фибробластами (ОАФ) (BrC4f), что выражается в снижении количества жизнеспособных FDA⁺-клеток. Добавление РВ-НК с ИЛ-15 или TGF β к сфероидам из SK-BR-3 не влияет на размер 3De и 3D-2, но все клетки в сфероиде являются PI⁺. Для 3De из MDA-MB-231 TGF β ингибирует киллерную активность РВ-НК, а при действии комбинации ИЛ-15+РВ-НК от всех 3D-2 остается только некротическое ядро. Можно отметить, что при добавлении к 3D моделям РВ-НК-клеток без дополнительной стимуляции клетки в 3D-2 с ОАФ остаются более жизнеспособными в сравнении с клетками 3De или 3D-2 с другими типами фибробластов. 3Df из BrC4f наиболее чувствительны к РВ-НК в комбинации с ИЛ-15 или TGF β . Для 3Df из BrC120f и BN120f TGF β +РВ-НК незначительно снижает процент FDA⁺-клеток.

Таким образом, разработаны трехмерные модели РМЖ человека, позволяющие исследовать динамические взаимодействия опухолевых, стромальных и иммунных клеток и проводить скрининг лекарственных препаратов для терапии РМЖ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-346

**МИКРОДЕЛЕЦИИ Y-ХРОМОСОМЫ С ЗАХВАТОМ РЕГИОНА AZFB
У РОССИЙСКИХ МУЖЧИН С БЕСПЛОДИЕМ****Y CHROMOSOME MICRODELETIONS INVOLVING
THE AZFB REGION IN RUSSIAN INFERTILE MEN**Е. А. Липатова, М. И. Штаут, О. А. Соловова, Т. М. Сорокина,
М. С. Казарян, О. А. Щагина, А. В. Поляков, В. Б. Черных*Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва*E. A. Lipatova, M. I. Shtaut, O. A. Solovova, T. M. Sorokina,
M. S. Kazaryan, O. A. Schagina, A. V. Polyakov, V. B. Chernykh*Research Centre for Medical Genetics, Moscow*

✉ lizalipatova02@gmail.com

Аннотация

Определена структура микроделетий длинного плеча Y-хромосомы в регионе AZFb среди 165 мужчин с бесплодием. У 25 % из них обнаружены делеции AZFb, из которых полные делеции AZFb (P5/proximal P1, P4/proximal P1) составляют 22 %, частичные AZFb — 3 %. Делеции AZFb+c у 75 % пациентов, из них полные AZFb+c — 98 %, частичные AZFb + полные AZFc — 2 %. Точки разрыва позволили уточнить размер и локализацию делеций, захватывающих палиндромную область Y-хромосомы, для 55 образцов.

Abstract

The pattern of microdeletions of the long arm of the Y chromosome in the AZFb region was determined among 165 men with infertility. AZFb deletions were found in 25 % of them, of which complete AZFb deletions (P5/proximal P1, P4/proximal P1) accounted for 22 %, partial AZFb deletions — 3 %. AZFb+c deletions in 75 % of patients, of which complete AZFb+c were 98 %, partial AZFb + complete AZFc were 2 %. Breakpoints allowed us to clarify the size and localization of deletions capturing the palindromic region of the Y chromosome for 55 samples.

Около 15 % супружеских пар сталкиваются с проблемами репродукции [1], мужской фактор составляет 50 % от общего числа случаев бесплодия в браке [2]. Микроделетии длинного плеча Y-хромосомы в локусе Yq11.2 или AZF (Azoospermia Factor, фактор азооспермии) являются одной из наиболее частых из известных генетически обусловленных причин мужского бесплодия [3]. Данный локус разделен на три региона: AZFa, AZFb, AZFc; в каждом из которых находятся гены, отвечающие за сперматогенез, делеции которых приводят к азооспермии или олигозооспермии [4]. Частота и типы микроделетий Y-хромосомы, захватывающих ее палиндромную область (P1-P8), существенно варьируют в зависимости от выборки пациентов, этнической принадлежности, а механизмы редких типов структурных вариантов Y-хромосомы и их влияние на мужскую фертильность недостаточно изучены.

Неаллельная гомологичная рекомбинация (NAHR) между палиндромом P5 и проксимальным плечом палиндroma P1 (P5/proximal P1) является наиболее частой причиной полных делеций региона AZFb [5], которые составляют 6-10 % всех патогенных делеций в локусе AZF [6]. Несбалансированная рекомбинация между палиндромом P5 или P4 и дистальным плечом палиндroma P1 (P5 или P4/distal P1) приводит к полным делециям AZFb+c, а между палиндромом P5 или P4 и проксимальным плечом палиндroma P1 (P5 или P4/proximal P1) приводит к полным делециям AZFb [5].

В работе исследовано наличие делеций в локусе AZF, для чего использовали «базовый» набор исследуемых маркеров и «расширенный», а также 2 контрольных гена/локуса Y-хромосомы в качестве внутреннего контроля (SRY и к ZFX/ZFY). «Базовый» набор маркеров: sY86, sY84, sY615 — AZFa; sY127, sY134 — AZFb; sY254, sY255 — AZFc. «Расширенный» набор маркеров позволил уточнить точки разрыва с затронутыми палиндромами: AZFb — sY1235 (палиндром P5); sY1237, sY 121 (палиндром P4); sY124, sY1302, sY142; sY1197 (палиндром P3); в области перекрытия регионов AZFb и AZFc: sY1192; sY1291 (палиндром P2). AZFc — sY1206 (distal P1); sY1125. К данным локусам были подобраны праймеры для мультиплексной ПЦР с последующей визуализацией продуктов амплификации с помощью электрофореза в 7 % полиакриламидном геле.

В результате ретроспективного анализа отобраны 165 образцов ДНК мужчин с делециями AZFb и AZFb+c, определенных по «классической» классификации AZF делеций, для 55 из них были уточнены типы по точкам разрыва. У 42 пациентов обнаружены делеции региона AZFb (25 %), из них частичные делеции AZFb встречаются у 5 мужчин (12 %), а полные делеции AZFb — у 37 пациентов (88 %). У 123 пациентов были выявлены делеции AZFb+c (75 %). Среди AZFb+c наиболее частыми являлись полные делеции AZFb+c, выявленные у 121 пациента (98 %), AZFb частичные + AZFc полные — у 2 пациентов (2 %).

Для 11 случаев с захватом региона AZFb уточнены точки разрыва для определения подтипа и механизма возникновения делеций. Из них у 8 пациентов данная генетическая особенность вызвана гомологичной рекомбинацией P4/proximal P1 (73 %), 1 — P4/Yq terminal (9 %), 1 — P4/distal P1 (9 %), 1- P5/distal P1 (9 %). Точки разрыва для делеций AZFb+c уточнены у 44 пациентов: из них у 22 мужчин — делеции области P5/Yq terminal (50 %), 7 делеций P4/distal P1 (16 %), 7 делеций P5/distal P1 (16 %), 3 делеции P4/Yq terminal (7 %), 2 делеции P4/distal P2 (4,5 %), 2 делеции P4/proximal P1 (4,5 %), 1 делеция P5/proximal P1 (2 %).

Таким образом, среди мужчин с бесплодием, вызванным микроделециями Y-хромосомы, которые захватывают регион AZFb, чаще встречаются делеции с захватом двух регионов AZFb и AZFc (AZFb+c), из которых наиболее распространены полные делеции P5/Yq terminal. Делеции AZFb встречаются в 3 раза реже, чем делеции AZFb+c. У пациентов с утраченным регионом AZFb преобладает рекомбинация между палиндромом P4 и проксимальным плечом палиндрома P1.

Применение только базового набора STS-маркеров позволяет выявить микроделеции на Y-хромосоме [7–9], но не установить точно тип AZF делеций. В случае из литературы пациенту при отсутствии «базовых» STS-маркеров (sY127 и sY134) была установлена делеция региона AZFb, однако после уточнения границ обнаруженной микроделеции выявлена редкая частичная делеция AZFb, которая возникла в результате рекомбинации между палиндромами P4 и P3 [10].

Использование «базовых» STS-маркеров (sY127 и sY134) позволило выявить полные AZFb делеции у 88,6 % пациентов, редкие частичные AZFb — 11,4 %, уточнение точек разрыва показало, что полные делеции AZFb обнаружены у 88,9 % мужчин, а частичные AZFb — у 11,1 %. Данный случай (как и случай из литературы, описанный выше) наглядно демонстрируют необходимость верификации делеций с уточнением точек разрыва [7–9].

Литература

1. Repping S., Skaletsky H., Lange J. et al. Recombination between Palindromes P5 and P1 on the Human Y Chromosome Causes Massive Deletions and Spermatogenic Failure // *Am. J. Hum. Genet.* 2002. V. 71. P. 906–922.
2. Leung A.K., Henry M.A., Mehta A. Gaps in male infertility health services research // *Transl Androl Urol.* 2018. V. 7. P. 303–309.
3. Vinci G., Raicu F., Popa L. et al. A deletion of a novel heat shock gene on the Y chromosome associated with azoospermia // *Mol Hum Reprod.* 2005. V.11. N. 4. P. 295–298.
4. Черных В.Б. AZF делеции — частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований // *Проблемы репродукции.* 2009. Т. 1. С. 10–5.
5. Kleiman S. E., Yogev L., Lehavi O. et al. The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: six new cases and a review of the literature (1994–2010) // *Fert Steril.* 2011. V. 95. №. 6. P. 2005–2012.
6. Vogt P.H., Bender U., Deibel B. et al. Human AZFb deletions cause distinct testicular pathologies depending on their extensions in Yq11 and the Y haplogroup: new cases and review of literature // *Cell & Bioscience.* 2021. V. 11. P. 1–13.
7. Simoni M., Bakker E., Eurlings M. C. et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions // *International journal of andrology.* 1999. V. 22. №. 5. P. 292–299.
8. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004 // *International journal of andrology.* 2004. V. 27. №. 4. P. 240–249.
9. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M. et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // *Andrology.* 2014. V. 2. №. 1. P. 5–19.
10. Рыжков А.И., Шорманов И.С., Ворчалов М.М. и др. Делеция региона AZFb хромосомы Y у пациента с олигозооспермией: клиническое наблюдение и обзор литературы // *Медицинская генетика.* 2021. Т. 20. №. 12. С. 40–52.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-347

СВЯЗЬ МЕЖДУ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ПОПЫТКАМИ САМОУБИЙСТВА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ***ASSOCIATION BETWEEN HIGH CONCENTRATIONS OF CIRCULATING CELL-FREE DNA AND SUICIDE ATTEMPTS IN SCHIZOPHRENIA**

М. М. Меламуд¹, Е. А. Ермаков¹, П. И. Брит¹, Е. С. Журавлёв¹, Е. А. Балахонова¹,
Г. А. Степанов¹, Д. А. Камаева², С. А. Иванова², Г. А. Невинский¹, В. Н. Бунева¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Научно-исследовательский институт психического здоровья,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

M. M. Melamud¹, E. A. Ermakov¹, P. I. Brit¹, E. S. Zhuravlev¹, E. A. Balakhonova¹,
G. A. Stepanov¹, D. A. Kamaeva², S. A. Ivanova², G. A. Nevinsky¹, V. N. Buneva¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

²Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS

✉ Marken94@mail.ru

Аннотация

В работе представлены результаты измерения концентрации общей, ядерной и митохондриальной циркулирующей внеклеточной ДНК в плазме крови при шизофрении. Показано, что концентрация общей и ядерной, но не митохондриальной внеклеточной ДНК значимо выше у пациентов с попытками суицида в анамнезе по сравнению с пациентами без попыток суицида и здоровыми лицами без психической патологии.

Abstract

The paper presents the results of measuring the concentration of total, nuclear and mitochondrial circulating cell-free DNA in blood plasma in schizophrenia. It has been shown that the concentration of total and nuclear, but not mitochondrial cell-free DNA, is significantly higher in patients with a history of suicide attempts compared to patients without suicide attempts and healthy individuals without mental pathology.

Внеклеточная ДНК (вкДНК) — это фрагменты нуклеиновых кислот, высвобождаемые из клеток при их разрушении, или секретлируемые клетками при сильном стрессовом воздействии. Несмотря на то, что вкДНК циркулирует в небольшом количестве в кровотоке здоровых людей, увеличение её концентрации может говорить о патологических процессах, направленных на целостность клеток. Одним из таких процессов является хроническое воспаление. На данный момент показано увеличение уровня вкДНК в крови пациентов с различными психическими заболеваниями, в том числе и с шизофренией [1], что может быть ассоциировано с воспалительными процессами. Также описано повышение вкДНК в крови людей, совершавших попытки самоубийства. Однако, во всех этих исследованиях изучаются люди с попытками самоубийств в отрыве от ведущего психического заболевания. В зависимости от органеллы происхождения молекул вкДНК делят на ядерную вкДНК и митохондриальную вкДНК. При исследовании всего пула молекул говорят об общей вкДНК. На данный момент большинство работ, в которых описывается вкДНК при психических заболеваниях, сфокусированы именно на общей вкДНК. Исследований, объектами которых являются ядерная и митохондриальная вкДНК, крайне мало. Актуальность настоящей работы заключается в том, что впервые был исследован уровень вкДНК в крови пациентов с шизофренией с попытками суицида в анамнезе и без таковых. Помимо прочего эта работа является одной из первых, где одновременно исследуется как уровень общей вкДНК, так и ядерной, и митохондриальной.

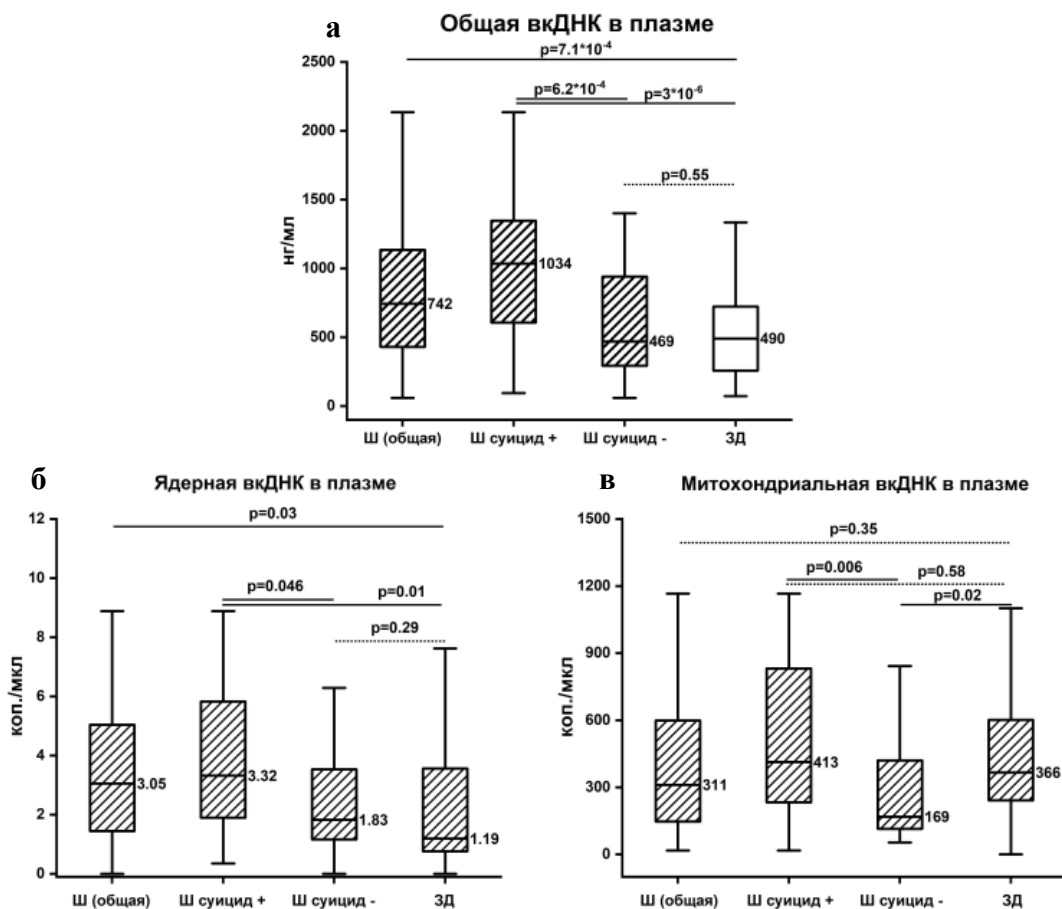
В исследовании использовалось 143 образца плазмы (58 — от пациентов с шизофренией (31 — от пациентов с шизофренией с попытками суицида в анамнезе, 27 — от пациентов с шизофренией без попыток суицида в анамнезе) и 85 — от здоровых доноров). Все группы пациентов были сопоставимы по половозрастному составу со здоровыми донорами. Концентрацию общей вкДНК определяли методом флуориметрической детекции

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-75-00102.

© М. М. Меламуд, Е. А. Ермаков, П. И. Брит, Е. С. Журавлёв, Е. А. Балахонова, Г. А. Степанов, Д. А. Камаева, С. А. Иванова, Г. А. Невинский, В. Н. Бунева, 2023

с использованием набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit на флуориметре Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, Германия). Концентрация ядерной и митохондриальной вкДНК определяли методом цифровой ПЦР на приборе QIAcuity One с использованием реагентов QIAcuity Probe PCR Kit (Qiagen, Германия). В качестве референсных генов использовали ген рибонуклеазы Р человека (RP) и ген субъединицы 1 НАДН-дегидрогеназы (ND1) для детекции геномной и митохондриальной вкДНК соответственно.

Уровень общей (см. рисунок, а) и ядерной (см. рисунок, б) вкДНК был достоверно выше в общей группе пациентов с шизофренией, чем у здоровых доноров. Концентрация общей (см. рисунок, а) и геномной (см. рисунок, б) внеклеточной ДНК в группе пациентов с шизофренией с попытками суицида была достоверно выше, чем у пациентов с шизофренией без попыток суицида и здоровых доноров. При этом концентрация общей (см. рисунок, а) и геномной (см. рисунок, б) вк-ДНК в плазме пациентов с шизофренией без попыток суицида статистически не отличалась от таковой у здоровых доноров. Концентрация циркулирующей митохондриальной вк-ДНК статистически не различалась в следующих трёх группах: шизофрения общая группа, шизофрения с попытками суицида и здоровые доноры (см. рисунок, в). При этом в группе пациентов с шизофренией без попыток суицида в анамнезе уровень митохондриальной внеклеточной ДНК был достоверно ниже, чем в группе с попытками суицида и здоровыми донорами (см. рисунок, в).



Концентрация общей вкДНК в плазме крови общей группы пациентов с шизофренией (Ш (общая)), пациентов с шизофренией с попыткой суицида в анамнезе (Ш суицид +), пациентов с шизофренией без попытки суицида в анамнезе (Ш суицид -) и здоровых доноров (ЗД). Числами на графике обозначены медианные значения для каждой из групп.

Значения p , рассчитанные по критерию Краскела — Уоллиса, указаны на рисунке

Благодаря полученным данным можно говорить о том, что повышение уровня вкДНК в крови пациентов с шизофренией не является однородным и зависит в том числе и от попыток суицида в анамнезе пациентов. На данный момент уже известно о том, что в структуре пациентов с шизофренией существует примерно 20 % с выраженным изменением уровня периферических маркёров воспаления. Возможно, эти люди также входят в группу риска по самоубийствам и назначение персонализированной вспомогательной противовоспалительной терапии в будущем может способствовать решению сразу двух проблем: облегчение течения шизофрении у людей с выраженным воспалением и снижение количества самоубийств в этой группе.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-348

**МОДИФИКАЦИЯ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
С ПОМОЩЬЮ НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ БЕЛКОВ****MODIFICATION OF AN ANTIBODY AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS
USING DIRECTED PROTEIN EVOLUTION**

Е. Е. Михайлова, И. К. Байков, Н. В. Тикунова

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

E. E. Mikhaylova, I. K. Baykov, N. V. Tikunova

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University*

✉ e.mikhailova2@gsu.ru

Аннотация

Получить модифицированные белковые молекулы с необходимыми исследователю свойствами можно различными методами. Одним из них служит направленная эволюция белков, которая имитирует процесс естественного отбора. Применение данного метода позволило повысить сродство одноцепочечного антитела sc14D5 к рекомбинантному домену III гликопротеина E европейского и сибирского субтипов вируса клещевого энцефалита.

Abstract

It is possible to obtain modified protein molecules with the properties necessary for the researcher by various methods. One of them is the directed evolution of proteins, which mimics the process of natural selection. The use of this method allowed to increase the affinity of the single-stranded antibody sc14D5 to the recombinant domain III of glycoprotein E of the European and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis virus.

Заражение человека вирусом клещевого энцефалита может привести к тяжелым поражениям центральной нервной системы. На данный момент выделяют три основных субтипа вируса клещевого энцефалита — дальневосточный, сибирский и европейский. Все они передаются человеку через укусы инфицированными иксодовыми клещами. В основе одного из перспективных направлений для противовирусной терапии этого заболевания лежит создание вируснейтрализующих рекомбинантных антител.

Ранее в лаборатории молекулярной микробиологии ИХФБМ СО РАН на основе вариабельных доменов протективного моноклонального мышинового антитела 14D5 было получено одноцепочечное антитело sc14D5, направленное на домен III гликопротеина E вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Анализ связывания данного антитела с различными вариантами рекомбинантного домена III продемонстрировал, что при довольно высокой аффинности ($K_D \sim 2 \times 10^{-9}$ нМ) к домену дальневосточного субтипа вируса, антитело sc14D5 проявляет на 1-2 порядка более низкое сродство к европейскому и сибирскому вариантам.

С целью повысить сродство sc14D5 к европейскому варианту домена III гликопротеина E ВКЭ, было решено провести направленную эволюцию этого антитела. Процесс включал в себя несколько этапов: получение разнообразия вариантов антител, несущих мутации, отбор наиболее аффинных представителей и их последующий анализ. Разнообразие вариантов получали с помощью мутагенеза исходного гена. Замены в последовательность вносили, используя ПЦР пониженной точности. В качестве метода для селекции антител был выбран фаговый дисплей с использованием ничтатого бактериофага M13. В итоге были получены два мутантных варианта одноцепочечного антитела, для которых далее был проведен иммуноферментный анализ с целью оценить их сродство к рекомбинантным вариантам домена III гликопротеина E ВКЭ. Результаты продемонстрировали, что антитела, полученные в результате данного исследования, обладают более высоким сродством к европейскому варианту домена III в сравнении с исходным антителом sc14D5. Так же было замечено, что в сравнении с антителом sc14D5 полученные в результате селекции антитела демонстрируют более высокое сродство к домену III гликопротеина E сибирского субтипа.

Далее на основе экспериментально установленной структуры комплекса «антитело sc14D5 — домен III гликопротеина E ВКЭ» с помощью программы UCSF Chimera были построены аналогичные структурные модели с антителами, полученными в результате направленной эволюции. Анализ этих структур позволил объяснить положительный вклад отобранных мутаций в стабилизацию комплекса антитела sc14D5 с сибирским и европейским вариантами домена III.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-349

**ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК
ТУВИНСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕВЕНИРОВАНИЯ***

**THE IDENTIFICATION BY EXOME SEQUENCING OF CANDIDATE BREAST CANCER GENES
IN BRCA-NEGATIVE TUVAN PATIENTS**

А. Ю. Молоков, П. А. Гервас, Н. В. Чердынцева

*Научно-исследовательский институт онкологии Томского НИМЦ
Томский государственный университет*

A. Yu. Molokov, P. A. Gervas, N. V. Cherdyntseva

*Cancer Research Institute of Tomsk NRC
Tomsk State University*

✉ amolokov@inbox.ru

Аннотация

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции по уровню заболеваемости во всем мире. В настоящий момент идет активное исследование генов вовлеченных в патогенез РМЖ, специфичных для этнических групп РФ. С целью поиска новых генов, ассоциированных с наследственным РМЖ, нами было проведено секвенирование экзона материала пациенток тувинской этнической группы с диагнозом РМЖ, которое показало, что одним из таких генов может быть ген LGR4.

Abstract

Breast cancer (BC) occupies a leading position in terms of morbidity worldwide. At the moment, there is an active study of genes involved in the pathogenesis of breast cancer, specific for the ethnic groups of the Russian Federation. In order to search for new genes associated with hereditary breast cancer, we performed exome sequencing of the material of patients of the Tuvan ethnic group diagnosed with breast cancer. Performed exome sequencing showed that the LGR4 gene could be involved in the pathogenesis of breast cancer.

Материалы и методы

В исследование было включено 7 пациенток с диагнозом РМЖ в возрасте до 50 лет, принадлежащих к тувинской этнической группе. Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови. ДНК-библиотеки подготавливали с использованием набора BGI Optimal DNA Library Prep Kit, для гибридизации использовали зонды Agilent SureSelect Human All Exon V6 (60M). Секвенирование проводилось на платформе DNBSeg-G400.

Результаты

По результатам биоинформатического анализа данных NGS была обнаружена патогенная мутация гена LGR4 (rs34804482, NM_001346432: c.A2459G: p.D820G). Известно, что данный ген кодирует рецептор, связанный с G-белком, который связывает R-спондины и активирует сигнальный путь Wnt. Патогенные мутации гена LGR4 нарушают активацию сигнального пути Wnt и приводят к развитию различных типов злокачественных новообразований, в том числе РМЖ [1]. Данная мутация представлена в мировой литературе и описана в статье Manchini A. et al. (2020), в данном исследовании соединили комбинацию анализа *in silico*, *in vitro* и *in vivo* и определили, что rs34804482 приводит к дефекту в белке Lgr4 и нарушает передачу сигналов Wnt/ β -катенина [2]. В нашем исследовании мутация гена LGR4 (rs34804482) была обнаружена у 43-летней пациентки, принадлежащей к тувинской этнической группе, с диагнозом рак молочной железы и отягощенным онкоанемнезом (у бабушки по матери был обнаружен рак пищевода).

Заключение

Впервые у пациентки, принадлежащей к тувинской этнической группе, с диагнозом рак молочной железы и отягощенным онкоанемнезом была обнаружена патогенная герминальная мутация гена LGR4 (rs34804482), ко-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-25-00386.
© А. Ю. Молоков, П. А. Гервас, Н. В. Чердынцева, 2023

торая может быть вовлечена в патогенез наследственного РМЖ. Значимость данной мутации в патогенезе РМЖ необходимо подтвердить на расширенной выборке пациенток с диагнозом РМЖ и здоровых женщинах тувинской этнической группы.

Литература

1. Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. Wnt signaling in cancer // *Oncogene*. 2017. V. 36. P. 1461–1473.
2. Mancini A., Howard S. R., Marelli F., Cabrera C. P., Barnes M. R., Sternberg M. J., Leprovots M., Hadjidemetriou I., Monti E., David A., Wehkalampi K., Oleari R., Lettieri A., Vezzoli V., Vassart G., Cariboni A., Bonomi M., Garcia M. I., Guasti L., Dunkel L. LGR4 deficiency results in delayed puberty through impaired Wnt/ β -catenin signaling // *JCI Insight*. 2020. V. 5(11). P. e133434.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-350

РЕПРЕССИЯ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ БЕЛКА DCAS12 НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

GENE REPRESSION USING THE DCAS12 PROTEIN IN A MODEL OBJECT *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Д. М. Моторина^{1,2}, Н. В. Баттулина¹¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университетD. M. Motorina^{1,2}, N. V. Battulina¹¹Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University

✉ d.motorina@g.nsu.ru

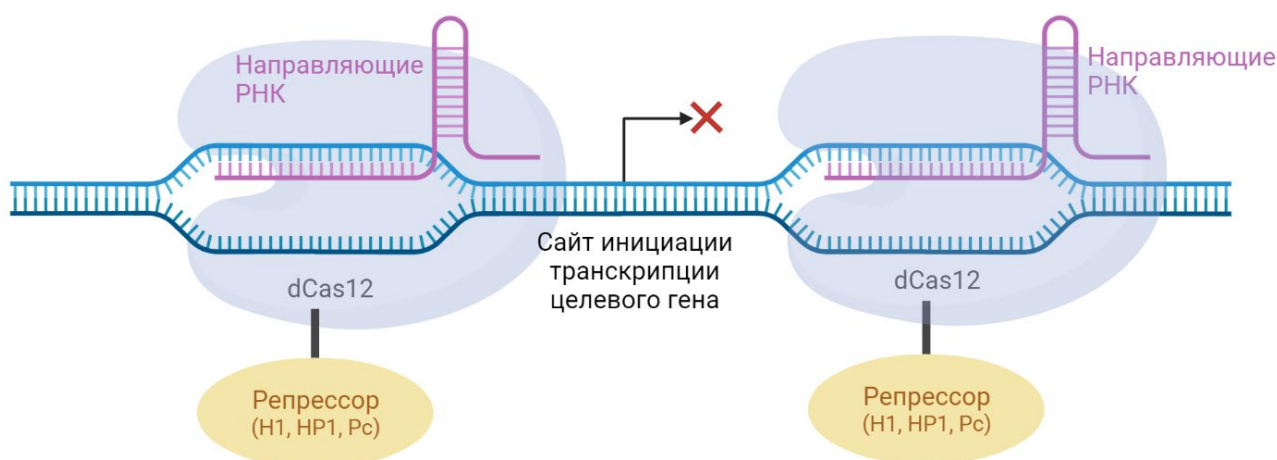
Аннотация

Для изучения функций генов необходимы методы, которые позволяют точно и предсказуемо контролировать экспрессию нужных генов. Цель данного проекта заключается в разработке эффективной системы для управляемой и направленной репрессии транскрипции целевых генов. Для этого белок Cas12, не обладающий ДНК нуклеазной активностью и слитый с различными репрессирующими факторами, будет привлекаться с помощью направляющих РНК к регуляторным областям интересующих генов, что приведет к последующей инактивации таких генов.

Abstract

To study the functions of genes, methods enabling precise and predictable control of the expression of the desired genes are required. The aim of this project is to develop an effective system for controlled and directed repression of transcription of target genes. To do that, the Cas12 protein, which does not have DNA nuclease activity and fused with various repressing factors will be attracted using guide RNAs to the regulatory regions of the genes followed by their inactivation.

Цель данного проекта состоит в разработке эффективной системы для контроля экспрессии генов путем репрессии транскрипции. Для этого будет использоваться белок Cas12 без ДНК нуклеазной активности (dCas12). Этот белок будет слит с различными репрессирующими факторами. Химерные белки dCas12-репрессор будут привлекаться с помощью направляющих РНК (см. рисунок) к регуляторным областям интересующих генов (а именно в область инициации, элонгации и терминации транскрипции). Мы полагаем, что привлечение одного или не-



Система репрессии интересующих генов на основе системы CRISPR/dCas12. Для подавления процессов инициации и элонгации транскрипции направляющие РНК подбираются к районам гена, расположенным выше и ниже сайта инициации транскрипции, соответственно

скольких химерных белков dCas12-репрессор в важные регуляторные районы интересующих генов может привести к компактизации хроматина и, следовательно, к подавлению транскрипции целевых генов *in vivo*. На первом этапе проект будет проводиться в культивируемых клетках S2 *D. melanogaster*. На втором этапе проекта система будет применена на модели целого организма, дрозофиле. Созданная система в дальнейшем сможет представлять альтернативу методу РНК интерференции (РНКи), который не всегда достаточно эффективен и зачастую приводит лишь к незначительному снижению количества транскриптов интересующего гена (в итоге РНКи количество белка снижается лишь в 1,5–2 раза и не имеет значимого эффекта и фенотипического проявления). Кроме того, мы полагаем, что система, разработанная в данном проекте, должна иметь меньший уровень неспецифических эффектов по сравнению с использованием РНКи.

Для усиления репрессорной активности белка dCas12 мы создали три химерных белка, состоящих из dCas12 и дополнительных репрессирующих факторов: Polycomb (Pc), Heterochromatin protein 1 (HP1), линкерный гистон H1. Выбор белков-репрессоров для создания химерных конструкций dCas12-репрессор основывается на следующих данных. С помощью метода DamID в культивируемых клетках Kc167 дрозофилы ранее было показано, что гистон H1 имеет более-менее равномерное распределение в гетерохроматине и эухроматине [1]. При этом характерные «провалы» в профиле связывания H1 с хроматином коррелируют с расположением активных стартов транскрипции и регуляторных элементов в межгенных участках. Сходные результаты были получены в статье [2] на эмбрионах дрозофилы. Для белка HP1 ранее было показано, что привлечение химерного белка lacI-HP1 к репортерным генам, расположенным на расстоянии 1.9 kb и 3.7 kb от lac оператора, приводит к подавлению активности обоих репортерных генов вследствие формирования закрытой структуры хроматина, состоящей из регулярно расположенных нуклеосом, как в прицентромерном гетерохроматине [3]. Путем привлечения белка Polycomb (Pc) к регуляторным районам интересующих генов мы надеемся инициировать сборку репрессорных белковых комплексов в целевых районах, что приведет к компактизации хроматина [4]. Мы планируем протестировать эти конструкции на эффективность репрессии интересующих генов в культивируемых клетках дрозофилы. Кроме того, для усиления репрессирующего эффекта мы используем несколько направляющих РНК к одному гену, чтобы связать эти белки с регуляторными областями генов, расположенными до и после старта транскрипции (± 150 п.о.), а также в области терминации транскрипции. Мы надеемся блокировать не только процессы инициации и элонгации транскрипции, но и влиять на процессирование РНК, препятствуя сборке CPA (cleavage and polyadenylation) комплекса [5]. Особенностью белка Cas12 является способность работать с целой каскадой направляющих РНК, что позволяет упростить конструкцию и нарабатывать все типы направляющих РНК с помощью лишь одного промотора. Данная особенность возникает из-за наличия в Cas12 РНК нуклеазной активности. В качестве мишеней мы выбрали гены *MBD-R2* и *Novel nucleolar protein 3 (Non3)*, которые изучаются в лаборатории клеточного деления ИМКБ СО РАН. Результаты работы могут быть применены в генетической инженерии, геномных технологиях, генной терапии и биотехнологиях.

Литература

1. Chen, P.; Zhao, J.; Wang, Y.; Wang, M.; Long, H.; Liang, D.; Huang, L.; Wen, Z.; Li, W.; Li, X.; et al. Corrigendum: H3.3 Actively Marks Enhancers and Primes Gene Transcription via Opening Higher-Ordered Chromatin. *Genes Dev.* 2021, 35, 782–782, doi:10.1101/gad.348504.121.
2. Hu, J.; Gu, L.; Ye, Y.; Zheng, M.; Xu, Z.; Lin, J.; Du, Y.; Tian, M.; Luo, L.; Wang, B.; et al. Dynamic Placement of the Linker Histone H1 Associated with Nucleosome Arrangement and Gene Transcription in Early Drosophila Embryonic Development. *Cell Death Dis* 2018, 9, 765, doi:10.1038/s41419-018-0819-z.
3. Danzer, J.R.; Wallrath, L.L. Mechanisms of HP1-Mediated Gene Silencing in Drosophila. *Development* 2004, 131, 3571–3580, doi:10.1242/dev.01223.
4. Kassis, J.A.; Brown, J.L. Polycomb Group Response Elements in Drosophila and Vertebrates. In *Advances in Genetics*; Elsevier, 2013; Vol. 81, pp. 83–118 ISBN 978-0-12-407677-8.
5. Omelina, E.S.; Letiagina, A.E.; Boldyreva, L.V.; Ogienko, A.A.; Galimova, Y.A.; Yarinich, L.A.; Pindyurin, A.V.; Andreyeva, E.N. Slight Variations in the Sequence Downstream of the Polyadenylation Signal Significantly Increase Transgene Expression in HEK293T and CHO Cells. *IJMS* 2022, 23, 15485, doi:10.3390/ijms232415485.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-351

**АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ В ГИДРОЛИЗЕ МИКРОРНК:
РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ*****ANTIBODY ACTIVITY IN MICRORNA HYDROLYSIS:
ROLE IN GENE REGULATION IN VIRAL INFECTIONS**А. О. Никитин^{1,2}, А. М. Тимофеева¹, С. Е. Седых^{1,2}, Г. А. Невинский^{1,2}¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*A. O. Nikitin^{1,2}, A. M. Timofeeva¹, S. E. Sedykh^{1,2}, G. A. Nevinsky^{1,2}¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*

✉ a.nikitin1@g.nsu.ru

Аннотация

При ряде вирусных и аутоиммунных заболеваниях описаны антитела с каталитической активностью, гидролизующие ДНК, РНК и некоторые олигопептиды. Антитела с РНК-гидролизующей могут иметь значение в деградации микроРНК и, как следствие, в изменении регуляции генов, осуществляемых с помощью микроРНК. Целью данной работы является исследование активности антител ВИЧ-инфицированных пациентов в гидролизе микроРНК.

Abstract

Antibodies with catalytic activity, hydrolyzing DNA, RNA and some oligopeptides have been described in a number of viral and autoimmune diseases. Antibodies with RNA-hydrolyzing activity can be important in the degradation of microRNAs and, as a consequence, in the change in the regulation of genes carried out with the help of microRNAs. The aim of this work is to investigate the activity of antibodies of HIV-infected patients in microRNA hydrolysis.

МикроРНК — короткие некодирующие РНК, участвующие в регуляции генов и связанные с различными заболеваниями, включая вирусные инфекции. Обнаружены изменения концентрации некоторых микроРНК в крови при/после вирусной инфекции, что делает их потенциальными прогностическими маркерами инфекций. В частности, микроРНК способны распознавать и связывать 3'-нетранслируемую область (UTR) определенных генов, ингибируя их экспрессию. Но сегодняшний день актуален вопрос о роли иммунной системы в регуляторном пути экспрессии генов, связанном с микроРНК. При некоторых вирусных и аутоиммунных заболеваниях описаны антитела с каталитической активностью, которые способны гидролизовать различные субстраты: ДНК, РНК, некоторые белки и олигопептиды. Антитела с РНК-гидролизующей могут иметь значение в деградации микроРНК, т.е. в изменении количества этой микроРНК и, как следствие, в целом влиять на путь экспрессии генов, связанном с регуляцией с помощью микроРНК.

Ранее показано, что антитела, образующиеся в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов проявляют широкий спектр каталитических активностей, однако до настоящего времени оценка РНК-гидролизующей активности этих антител не исследовалась. **Целью** данной работы является исследование активности антител ВИЧ-инфицированных пациентов в гидролизе микроРНК.

В данной работе получены гомогенные препараты IgG крови 26 ВИЧ-инфицированных пациентов, не получавших антиретровирусной терапии. В качестве контроля использовали IgG здоровых доноров без аутоиммунных и хронических инфекций. В качестве субстрата выбрано и синтезировано 4 флуоресцентно-меченных микроРНК: miR-766-3p, miR-9-5p, miR-326 и miR-155-5p. При ВИЧ-инфекции показано изменение экспрессии этих микроРНК [1–4].

В данной работе впервые показано, что IgG крови ВИЧ-инфицированных пациентов проявляют активность в гидролизе всех исследованных miRNA.

Ранее показано и подтверждено в данной работе, что антитела здоровых доноров проявляют каталитическую активность, однако активность этих антител значительно ниже, чем при вирусных инфекциях и аутоиммунных патологиях. В данной работе показано, что активность гидролиза трех микроРНК (miR-9-5p, miR-155-5p,

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 21-75-10105 (рук. А. М. Тимофеева).

© А. О. Никитин, А. М. Тимофеева, С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2023

miR-326) была статистически достоверно выше в группе ВИЧ-инфицированных пациентов, по сравнению с контрольной группой (t-критерий Стьюдента ($p < 0.05$)). В гидролизе miR-766 не выявлено достоверных различий для исследованных групп пациентов, по-видимому, данная микроРНК не имеет решающего значения при патогенезе ВИЧ.

Оценено расположение сайтов гидролиза в пространственной структуре микроРНК. Интересной особенностью гидролиза всех четырех микроРНК является то, что сайты расщепления расположены преимущественно в дуплексных зонах этих РНК и в меньшей степени в их шпилечных структурах. Кроме того, некоторые сайты расщепления соответствуют 5'-концевым фрагментам этих микроРНК, не участвующим в образовании дуплексов.

Корреляционный анализ показал обратную зависимость между активностью гидролиза микроРНК и уровнем вирусной нагрузки пациента.

Таким образом, в данной работе впервые показано, что антитела ВИЧ-инфицированных пациентов активны в гидролизе микроРНК, причем для трех микроРНК активность гидролиза была статистически достоверно выше, чем в контрольной группе.

Литература

1. Wan T et al. Biological differentiation of traditional Chinese medicine from excessive to deficient syndromes in AIDS: Comparative microRNA microarray profiling and syndrome-specific biomarker identification. // *J Med Virol*. 2021 Jun. Vol. 93(6). P. 3634–3646.
2. Chinnapaiyan, S., Dutta, R.K., Nair, M. et al. TGF- β 1 increases viral burden and promotes HIV-1 latency in primary differentiated human bronchial epithelial cells. // *Sci Rep*. 2019 Aug. Vol. 9 (1). P. 12552.
3. Laurent Houzet et al. The extent of sequence complementarity correlates with the potency of cellular miRNA-mediated restriction of HIV-1. // *Nucleic Acids Research*. 2012 Dec. Vol. 40. Issue 22. P. 11684–11696.
4. Faia C et al. Attenuated Negative Feedback in Monocyte-Derived Macrophages From Persons Living With HIV: A Role for IKAROS. // *Front. Immunol*. 2021 Nov. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.785905>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-352

ИССЛЕДОВАНИЕ АВТОНОМНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СТРУКТУРНОГО МОТИВА 3 α -ПУЧОК^{*}

STUDY OF THE AUTONOMOUS STABILITY OF THE THREE-HELIX BUNDLE STRUCTURAL MOTIF

К. С. Никольский, Л. И. Куликова, Д. В. Петровский, В. Р. Руднев, А. Л. Кайшева

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

K. S. Nikolsky, L. I. Kulikova, D. V. Petrovskiy, V. R. Rudnev, A. L. Kaysheva

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

✉ glucksistemi@gmail.com

Аннотация

Данная работа посвящена исследованию автономной стабильности структурного мотива 3 α -пучок, часто встречаемого в разнообразных классах белков. Исследование проведено на большой выборке из банка белковых структур (PDB), имеющих пространственную укладку 3 α -пучок. С помощью молекулярной динамики показана автономная стабильность исследуемых укладок вне белкового окружения в водной среде.

Abstract

This work is devoted to the study of the autonomous stability of the three-helix bundle structural motif, which is often found in functionally diverse protein classes. The study was carried out on a large set of protein structures selected from the bank (PDB) with a spatial packing of the three-helix bundle. With the help of a molecular dynamics experiment, the autonomous stability of the studied folds outside the protein in the aquatic environment was shown.

Мотив 3 α -пучок представляет собой структурный мотив, имеющий уникальную и компактную пространственную укладку из трех последовательно идущих спиралей, соединенных между собой нерегулярными участками. Чаще всего 3 α -пучки имеют длину около 80 аминокислот, при этом длины перетяжек и α -спиралей могут быть различны. Спирали 3 α -пучка формируют гидрофобное ядро, стабилизирующее всю укладку. Структурный мотив характеризуется большим количеством водородных и гидрофобных взаимодействий между спиральями. Впервые эта структура была описана в 1990 году [1]. Укладка 3 α -пучок — часто встречается как в малых белках, так в крупных гомологичных и негомологичных белках.

Исследование 3 α -пучков представляется актуальным и важным, поскольку исследуемый структурный мотив являются частью функционально разнообразных классов белков: ДНК-связывающие белки, ферменты, лизины и ингибиторы ферментов [2,3]. В последние годы активно разрабатываются каркасы на базе мотива 3 α -пучка в инженерии искусственных белков со свойствами антител, или аффибоди. Аффибоди применяются для решения широкого спектра задач в области биомедицины — биоразделение, диагностика, функциональное ингибирование, иммуноаффинное связывание вирусных белков и визуализация опухолей *in vivo* [4,5].

С использованием методов искусственного интеллекта мы выявили и аннотировали 1377 белков различного размера, содержащих в своем составе исследуемый структурный мотив.

Работа представляет собой обширное исследование: проведены эксперименты молекулярной динамики в трех температурных режимах:

- малых белков, имеющих пространственную укладку этого мотива;
- целых белков, содержащих в своем составе исследуемую укладку;
- автономных мотивов вне белкового окружения.

На каждом этапе проводился анализ основных параметров структур: радиус гирации, площадь, доступная на растворитель (SASA), количество гидрофобных и водородных связей, среднее квадратичное отклонение C $_{\alpha}$ -атомов (RMSD).

Проведенные исследования с малыми белками, имеющими пространственную укладку 3 α -пучка, показали стабильность этих белков. Поведение мотивов в белковом окружении в ходе МД по всем показателям также демонстрирует устойчивость исследуемого мотива. Проведенный анализ основных параметров в ходе МД, распознанных в крупных белках и автономно участвовавших в эксперименте молекулярной динамики, показал, что

^{*} Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Российской Федерации на долгосрочный период 2021–2030 гг. (№ 122092200056-9).

поведение мотива в ходе эксперимента по основным параметрам говорит в пользу стабильности структуры.

Таким образом, результаты исследования показывают, что структурный мотив 3α -пучок можно рассматривать в качестве самостоятельного структурного блока для решения широкого круга задач. При этом можно использовать как малые белки, имеющие укладку 3α -пучка, так и автономно 3α -пучки, в природе встречающиеся в структуре глобулы белков большего размера, что позволяет существенно повысить производительность расчетных задач без существенной потери информации.

Литература

1. Cohen, C.; Parry, D. A. D. α -Helical Coiled Coils and Bundles: How to Design an α -Helical Protein // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1990. V. 7 (1). P. 1–15. <https://doi.org/10.1002/prot.340070102>.
2. Steitz, T.A. Structural Studies of Protein-Nucleic Acid Interaction: The Sources of Sequence-Specific Binding // *Q Rev Biophys*. 1990. V. 23 (3). P. 205–280. <https://doi.org/10.1017/s0033583500005552>.
3. Kaufmann, E.; Knöchel, W. Five Years on the Wings of Fork Head // *Mech Dev*. 1996. V. 57 (1). P. 3–20. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(96\)00539-4](https://doi.org/10.1016/0925-4773(96)00539-4)
4. Nygren, P.-A. Alternative Binding Proteins: Affibody Binding Proteins Developed from a Small Three-Helix Bundle Scaffold // *FEBS J*. 2008. V. 275 (11). P. 2668–2676. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06438.x>.
5. Frejd, F. Y.; Kim, K.-T. Affibody Molecules as Engineered Protein Drugs // *Exp Mol Med*. 2017. V. 49 (3). e306–e306. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.35>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-353

**РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ КЛЕТКИ,
УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕГЕНЕРАЦИИ ТРАВМИРОВАННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ****CELL RECEPTORS AND SIGNALING PATHWAYS
INVOLVED IN THE REGENERATION OF INJURED PERIPHERAL NERVES**

Я. С. Отряскин, А. В. Юртова, С. И. Пиняев

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск

Ya. S. Otryaskin, A. V. Yurtova, S. I. Pinyaev

Ogarev Mordovia State University, Saransk

✉ komrad.pinyaev2009@ya.ru

Аннотация

В работе рассматривается процесс травмы периферических нервных волокон и возможность влиять на их регенерацию через реакции, опосредованные взаимодействием с рецепторами, активирующими сигнальные пути. Такие пути как RAS/ERK, PI3K, PLC- γ , JAK-STAT, MAPK/ERK, JNK и p38MAPK являются ключевыми в передаче сигнала через биохимические каскадные реакции, а модулируя их можно ускорить процесс восстановления поврежденных нервных волокон.

Abstract

The paper considers the process of injury to peripheral nerve fibers and the possibility of influencing their regeneration through reactions mediated by interaction with receptors that activate signaling pathways. Pathways such as RAS/ERK, PI3K, PLC- γ , JAK-STAT, MAPK/ERK, JNK and p38MAPK are key in signal transduction through biochemical cascade reactions, and modulating them can speed up the process of repair of damaged nerve fibers.

Регенерация периферических нервов — это целый мультимолекулярный комплекс, включающий в себя многие компоненты, опосредованные взаимодействием с рецепторами и активацией сигнальных путей. Каждый сигнальный каскад имеет свои особенности, рецепторы и лиганды. Распознавание сигнальных молекул, для дальнейшей активизации сигнального пути начинается на мембране клетки при участии специальных высокоизбирательных белков рецепторов.

Изучение рецепторов и сигнальных клеточных путей открывает перед исследователями широкие перспективы коррекции различных патологических состояний, говоря о патологиях нервной системы, то модулируя передачу биохимических каскадных реакций, можно направить развитие нейронов по тому или иному клеточному пути, а также ускорить процесс регенерации травмированных нервных волокон.

После повреждения травмированные нейроны должны перейти от режима передачи биопотенциалов к режиму роста и начать продуцировать белки, имеющие потенциал для стимуляции регенерации. АТФ быстро высвобождается ранеными нейронами, и это способствует активации ряда внутриклеточных сигнальных путей в шванновских клетках, включая Ca^{2+} , аденилатциклазу, ERK 1/2 и CREB, которые приводят к активации клеток глии и направлены на восстановление функций нерва [1].

Важную роль при передаче сигнала внутри клетки играют модификации белков, например, фосфорилирование, осуществляемое протеинкиназами. Донором фосфата во всех таких реакциях является γ -фосфат АТФ. У млекопитающих JAK/STAT путь является основным сигнальным механизмом для широкого спектра цитокинов и факторов роста. Активация JAK стимулирует клеточную пролиферацию, дифференциацию, миграцию клеток и апоптоз.

Также в процессе развития ПНС шванновские клетки продуцируют коллаген IV типа, ламинины, энтактин/нидоген и гепаран-сульфат протеогликаны, а фибробласты — коллагены I и III типов, а также фибронектин. Ламинины и фибронектин являются основными компонентами внеклеточного матрикса, стимулирующими рост нейритов *in vivo*. Для взаимодействия с ламинином на поверхности нейронов имеются интегриновые рецепторы, а интегрины служат для связывания с фибронектином. Связывание интегринов конуса роста с ламинином или фибронектином является сигналом к перестройке цитоскелета и элонгации аксона. Помимо матриксов-стимуляторов роста нейритов существуют матриксы-ингибиторы, которые в физиологических условиях ограничивают формирование коллатералей и нежелательный рост аксона, а после травмы тормозят регенерацию нерва [2].

Самым главным компонентом в регенерации периферического нерва является шванновская клетка и экспрессирующие ее вещества (различные факторы роста: BDNF, GDNF и др.). Наиболее изученными являются тирозинкиназные рецепторы. Это семейство трех рецепторных тирозинкиназ, каждая из которых может быть активирована одним или несколькими из четырех нейротрофинов — факторов роста нервов (NGF), нейротрофическим фактором мозга (BDNF) и нейротрофинами 3 и 4 (NT3 и NT4). В нервной системе взрослых, Trk рецепторы регулируют синаптическую силу и пластичность. Активация Trk-рецепторов приводит к пролиферации и выживанию, аксональному и дендритному росту и к мембранной передаче и модификации синаптических функций. Рецепторы нейротрофических факторов локализуются на поверхности нейронов, шванновских клеток и эндотелиоцитов. Было выяснено, что нейротрофические факторы, связываясь соответствующими рецепторами, активирует сигнальные пути RAS/ERK, PI3K, PLC- γ , JAK-STAT.

Сигнальные пути MAPK / ERK, JNK и p38MAPK активизируются после травмы нерва. MAPK / ERK участвует во многих физиологических кальциевых процессах, включая метаболизм, выживание, апоптоз, пролиферация и дифференцировка клеток. В обоих ПНС и ЦНС, путь ERK 1/2 является решающим для миелинизации и поддержания миелина. Однако шванновские клетки отвечают на повреждение ПНС сильной активацией пути ERK и при отсутствии травмы нерва, его активации достаточно, чтобы привести к демиелинизации и вызвать воспалительный ответ. Некоторые авторы показали, что избыточная активность ERK индуцирует активацию c-Jun *in vivo* и ERK отрицательно влияет на демиелинизацию и экспрессию c-Jun [3].

Травмирование периферического нерва приводит к невrome на месте повреждения, изменению морфологии близлежащих мышц. В результате человек приобретает инвалидность, хронические боли и становится нетрудоспособным, что приводит к социальным проблемам. Поэтому новые подходы к эффективному лечению регенерации периферических нервов жизненно необходимы и одним из возможных решений может быть влияние через разные клеточные сигнальные пути.

Литература

1. Negro S. ATP Released by Injured Neurons Activates Schwann Cells / S. Negro, U. Rodella // Front Cell Neurosci. 2016. Vol. 10. P. 1–6.
2. Карагяур М. Н. Современные подходы к регенерации периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии / М. Н. Карагяур, П. И. Макаревич, Е. К. Шевченко [и др.] // Гены & клетки. 2017. Т. 12, № 1. С. 6–14.
3. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury/ N. Gianluigi, J. Claire // Cellular and Molecular Life Sciences. 2020.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-354

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АРХИТЕКТУРЫ В АСТРОЦИТАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VITRO***EVALUATION OF CHANGES IN THE MITOCHONDRIAL ARCHITECTURE IN ASTROCYTES IN AN *IN VITRO* MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE**

А. Д. Охальников, А. О. Моторина, М. С. Гавриш, А. А. Бабаев

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

A. D. Okhalknikov, A. O. Motorina, M. S. Gavrish, A. A. Babaev

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ a11o20@mail.ru

Аннотация

Болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание, чей патогенез неразрывно связан с длительным нарушением метаболических процессов в нейрональных и глиальных клетках. По литературным данным, митохондриальная дисфункция способствует активации различных сигнальных механизмов, приводящих к перепрограммированию метаболизма клетки, что способствует развитию заболевания.

Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease whose pathogenesis is inextricably linked with a long-term disruption of metabolic processes in neuronal and glial cells. According to the literature data, mitochondrial dysfunction contributes to the activation of various signaling mechanisms leading to reprogramming of cell metabolism, which contributes to the development of the disease.

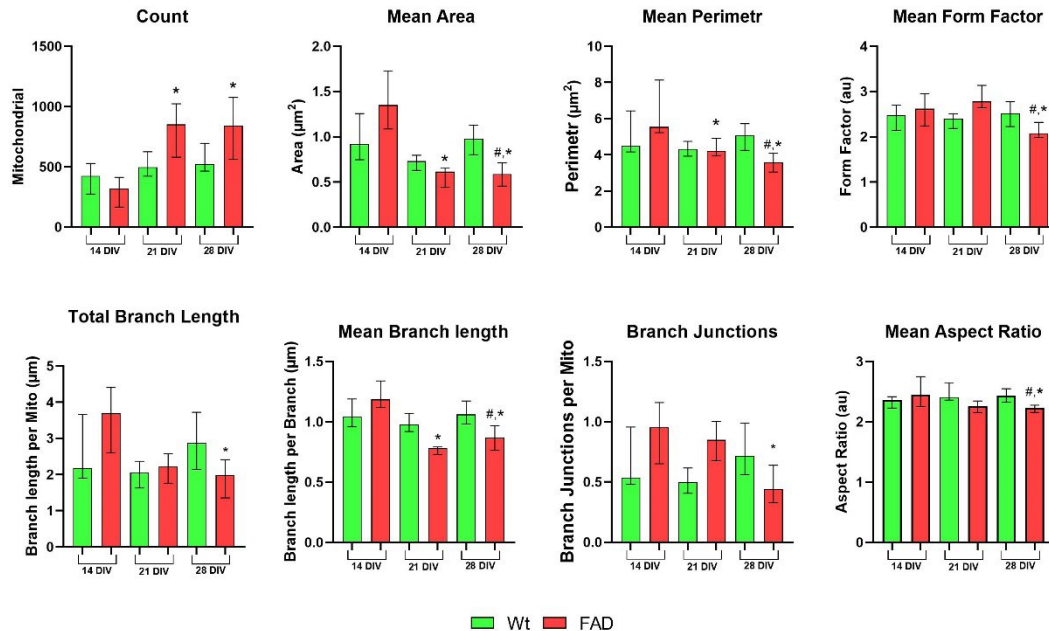
Митохондрии — консервативные внутриклеточные органеллы, выполняющие ряд важных функций: энергетическая, буферизация Ca^{2+} , контроль процессов апоптоза и т.д. Эти органеллы организованы в общую митохондриальную сеть, которая постоянно реорганизуется за счет процессов слияния и разделения митохондрий. Метаболическая стабильность глиальных и нейрональных клеток напрямую зависит от правильного функционирования митохондриальной сети. Ее распад на сегментированные участки может свидетельствовать о физиологических нарушениях в работе клетки. По литературным данным, накопленный внутри клеток $A\beta$ может связываться с белками внешней мембраны митохондрий, нарушая их метаболический обмен с цитозолем, проникать в митохондриальный матрикс, где блокирует работу 4 комплекса цепи переноса электрона, а также изменять работу поринов. Также известно, что при болезни Альцгеймера изменяется количество митохондрий и их морфология. Большинство исследований направлены на изучение морфологические изменения митохондрий в нейронах, но в последние годы интерес к роли митохондриальной дисфункции в глиальных клетках при нейродегенеративных заболеваниях стремительно вырос.

В связи с этим, целью данной работы явилось охарактеризовать изменения митохондриальной архитектуры астроцитов при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro*.

В качестве модели болезни Альцгеймера были выбраны трансгенные мыши линии 5xFAD, несущие человеческие гены APP и PSEN1 с пятью мутациями, связанными с ускоренным амилоидозом. Носители обоих трансгенов были отнесены в опытную группу «FAD», в качестве контроля выступали мыши дикого типа из группы «Wt». Митохондрии в астроцитарных культурах, полученных из коры головного мозга новорожденных мышей, анализировались на 14, 21 и 28 дни культивирования (DIV). Для визуализации митохондриальной архитектуры астроцитов применяли краситель MitoTracker Green FM. Обработку полученных данных осуществляли в приложении Image J с дополнительным плагином Mitochondria analyzer. Построение графиков и статистическую обработку производили в приложении GraphPad Prism 8.4.3.

Результаты (см. рисунок) показали, что митохондриальная сеть мышей с признаками болезни Альцгеймера на ранних стадиях культивирования (14 DIV) статистически значимо не отличается от дикого типа. Однако, уже на 21 DIV и 28 DIV наблюдается понижение средней площади и периметра митохондрий («Mean Area», «Mean Perimeter») внутри группы «FAD» по сравнению с 14 DIV. Также на 28 DIV разница в этих показателях присутствует

между группой «Wt» и «FAD». Помимо этого, на 28 DIV митохондрии в группе «FAD» становятся более округлыми, о чем сигнализирует уменьшение показателя «Mean Form Factor» по сравнению с контролем. Дополнительно можно наблюдать уменьшение связности митохондрий в группе «FAD» на 21 DIV и 28 DIV, о чем свидетельствует снижение показателей «Total Branch Length», «Mean Branch length» и «Branch Junctions».



Морфологические показатели митохондрий в астроцитарных культурах, полученных от мышей линии 5xFAD. Все данные представлены в виде Median with interquartile range. * — данные статистически значимы ($p < 0,05$) относительно группы «FAD» на 14 DIV, # — данные статистически значимы ($p < 0,05$) между группами «Wt» и «FAD» на 28 DIV. Статистическую обработку проводили с помощью Kruskal-Wallis test совместно с Dunn's multiple comparisons test

Таким образом, митохондриальная сеть в астроцитах, полученных от мышей линии 5xFAD, претерпевает морфологические изменения к 28 DIV: наблюдается уменьшение периметра и площади митохондрий, а также увеличение их сегментированности. Все это может быть результатом ранней дисфункции митохондрий при болезни Альцгеймера.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-355

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ И МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА (НФП) У НОВОРОЖДЕННЫХ И ПОДРОСТКОВ

HETEROGENEITY OF GENETIC ETIOLOGIES AND METHODS FOR DETECTING SEX DIFFERENTIATION DISORDERS (SDD) IN NEWBORNS AND ADOLESCENTS

Н. С. Павлова, П. Н. Цабай, З. К. Батырова, З. Х. Кумыкова, А. С. Большакова, Е. В. Уварова, Д. Ю. Трофимов

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

N. S. Pavlova, P. N. Tsbai, Z. K. Batyrova, Z. Kh. Kумыkova, A. S. Bolshakova, E. V. Uvarova, D. Yu. Trofimov

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

✉ pav.nad.ser@gmail.com

Аннотация

Обследованы 27 пациентов с нарушениями формирования пола (НФП). Генетическая этиология выявлена у 22 из 27 пациентов (81.5 %). В 14.8 % случаев методом выявления было кариотипирование, в 3.7 % случаев — ПЦР гена SRY, в 63 % случаев — полноэкзомное секвенирование.

Abstract

Twenty-seven patients with sex differentiation disorders (SDD) were examined. Genetic etiology was revealed in 22 out of 27 patients (81.5 %). Karyotyping was the method of detection in 14.8 % of cases, PCR of the SRY gene in 3.7 % of cases, and full-exome sequencing in 63 % of cases.

Введение

Нарушения формирования пола (НФП) — группа врожденных патологий развития, которые характеризует несоответствие хромосомного пола паспортному. Фенотипические проявления НФП разнообразны, и варьируют от незначительных пороков развития (например, крипторхизма или гипертрофии клитора) до полной дискордантности между кариотипическим и фенотипическим полом [1]. Генетическая этиология НФП гетерогенна, начиная от хромосомных аномалий до однонуклеотидных замен (известно более 80 генов). Клинические проявления при различной этиологии могут пересекаться, и не являются достоверным предиктором генетической причины НФП, что усложняет диагностику. В то же время от своевременной и корректной диагностики зависит принятие последующих медицинских решений, включая решение о коррекции пола [2].

Цель

Определить генетическую причину НФП и оценить выявляемость с использованием классических и современных методов медицинской генетики в группе девочек-подростков и новорожденных детей с нарушениями формирования пола.

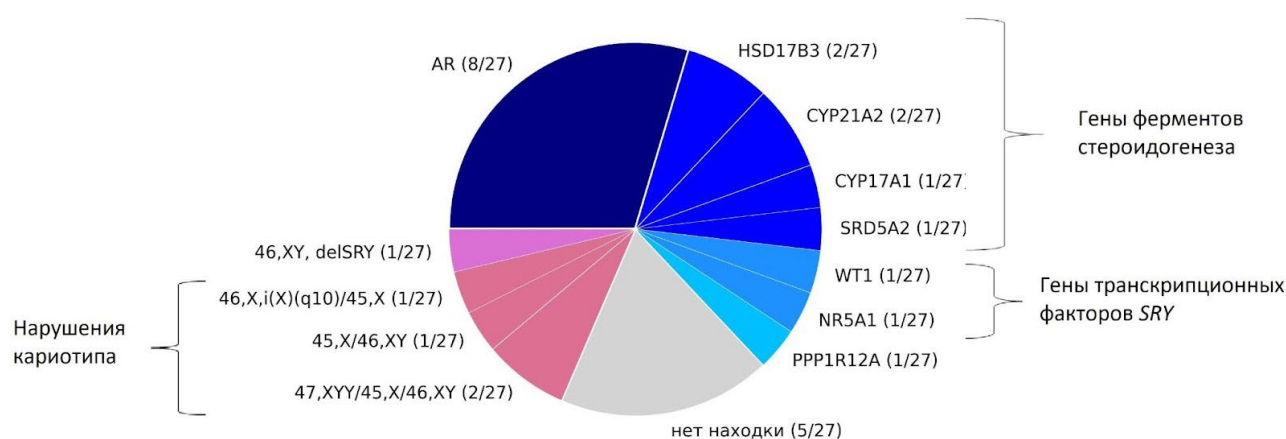
Методы

В исследовании приняли участие 27 пациентов ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова Минздрава России. Среди них — 20 девочек-подростков с несоответствием паспортного пола цитогенетическому (кариотип 46, XY) и 7 новорожденных с подозрением на НФП. Информированное согласие на проведение генетических исследований, а также использование деперсонализированных клинических данных было получено от законных представителей всех пациентов. При установлении генетической причины НФП в первую очередь использовали метод кариотипирования клеток периферической крови. При обнаружении мозаичных вариантов кариотипа дополнительно проводилось FISH-исследование для уточнения степени мозаицизма. При обнаружении нормального мужского кариотипа 46, XY проводилось выявление наличия локусов AZF и гена SRY методом ПЦР, в случае их наличия — полноэкзомное секвенирование для установления моногенной причины НФП.

Результаты

Средний возраст постановки диагноза среди девочек-подростков составил $14,1 \pm 2,36$ года.

Генетическая этиология НФП была выявлена у 22 пациентов из 27 (81,5 %, см. рисунок). Из них у 4 пациентов (14,8 %) с использованием метода кариотипирования и FISH-диагностики по лимфоцитам периферической крови выявлены нарушения кариотипа. Из них в двух случаях обнаружен мозаичный кариотип 47,XY/45,X/46,XY, в одном — мозаичный кариотип 45,X/46,XY, и в одном — мозаичный кариотип 46,X,i(X)(q10)/45,X. С использованием метода полноэкзомного секвенирования у 17 пациентов выявлена моногенная причина НФП (63 %). Из них у 8 пациентов были обнаружены варианты в гене андрогенового рецептора *AR*; у 6 — варианты в генах ферментов стероидогенеза (*CYP21A2*, *CYP17A1*, *HSD17B3*, *SRD5A2*), у 2 — в генах транскрипционных факторов гена *SRY* (*WT1*, *NR5A1*), и у 1 — в гене *PPP1R12A*. У одной пациентки была выявлена делеция гена *SRY* на Y-хромосоме методом ПЦР (3,7 %).



Генетическая этиология у пациентов с НФП. Синим цветом обозначены пациенты с моногенными причинами НФП, красным цветом — с хромосомными аномалиями, включая нарушения кариотипа

Среди 8 пациентов с вариантами в гене *AR* у одного при рождении был установлен мужской пол; ввиду интерсексуального строения гениталий диагноз был поставлен на первом году жизни. Всем пациенткам с вариантами в генах ферментов стероидогенеза при рождении был назначен женский пол, однако 5 из 6 имели признаки вирилизации гениталий, 3 из них диагноз был поставлен на первом году жизни. Среди 4 пациентов с нарушениями кариотипа у одного был установлен мужской пол при рождении, у 3 — женский (при отсутствии вирилизации). Среди 2 пациенток с вариантами в генах транскрипционных факторов гена *SRY* у одной наблюдалась вирилизация гениталий, а диагноз был поставлен на первом году жизни.

Заключение

В 81,5 % случаев была установлена генетическая причина НФП; в 14,8 % случаев методом выявления был кариотип, в 3,7 % — ПЦР гена *SRY*, в 63 % — полноэкзомное секвенирование. Клинические проявления при различной этиологии могут пересекаться, и не являются достоверным предиктором генетической причины НФП, поэтому при диагностике необходим индивидуальный подход к пациентам и возможность применения ряда классических и современных медико-генетических методик.

Литература

1. Délot E. C., Vilain E. Towards improved genetic diagnosis of human differences of sex development // Nature Reviews Genetics. 2021. Т. 22. №. 9. С. 588–602.
2. Никитина И. Л., Кудряшова Е. К., Тодиева А. М. и др. К вопросу о своевременной диагностике нарушений формирования пола // Лечащий врач. 2020. № 3. С. 17–21.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-356

**АДАПТАЦИЯ ШАПЕРОННОЙ МАШИНЫ КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА HT1080
К ПОТЕРЕ HSP90A В РЕЗУЛЬТАТЕ НОКАУТА ГЕНА *HSP90AA1*****ADAPTATION OF THE CHAPERONE MACHINE OF HUMAN FIBROSARCOMA HT1080 CELLS TO THE
LOSS OF HSP90A AS A RESULT OF THE KNOCKOUT OF THE *HSP90AA1* GENE**

В. С. Петренко, В. В. Врублевская, М. А. Жмурина, Ю. Ю. Скарга, О. С. Моренков

Институт биофизики клетки РАН, Пущино

V. S. Petrenko, V. V. Vrublevskaia, M. A. Zhmurina, Yu. Yu. Skarga, O. S. Morenkov

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino

✉ 79182797935@yandex.ru

Аннотация

Нокаут гена *HSP90AA1*, кодирующего Hsp90 α , в клетках фибросаркомы человека HT1080 сопровождался адаптацией клеточной шаперонной машины к потере Hsp90 α . Адаптация включала в себя повышение экспрессии Hsp90 β , ключевых ко-шаперонов Hsp90, шаперонов и ко-шаперонов Hsp70/Hsp40 комплекса, компонентов комплекса TRiC/CCT, префолдинов, префолдиноподобных PFDL, R2TP и R2SP шаперонных комплексов, а также ключевых митохондриальных шаперонов и шаперонинов.

Abstract

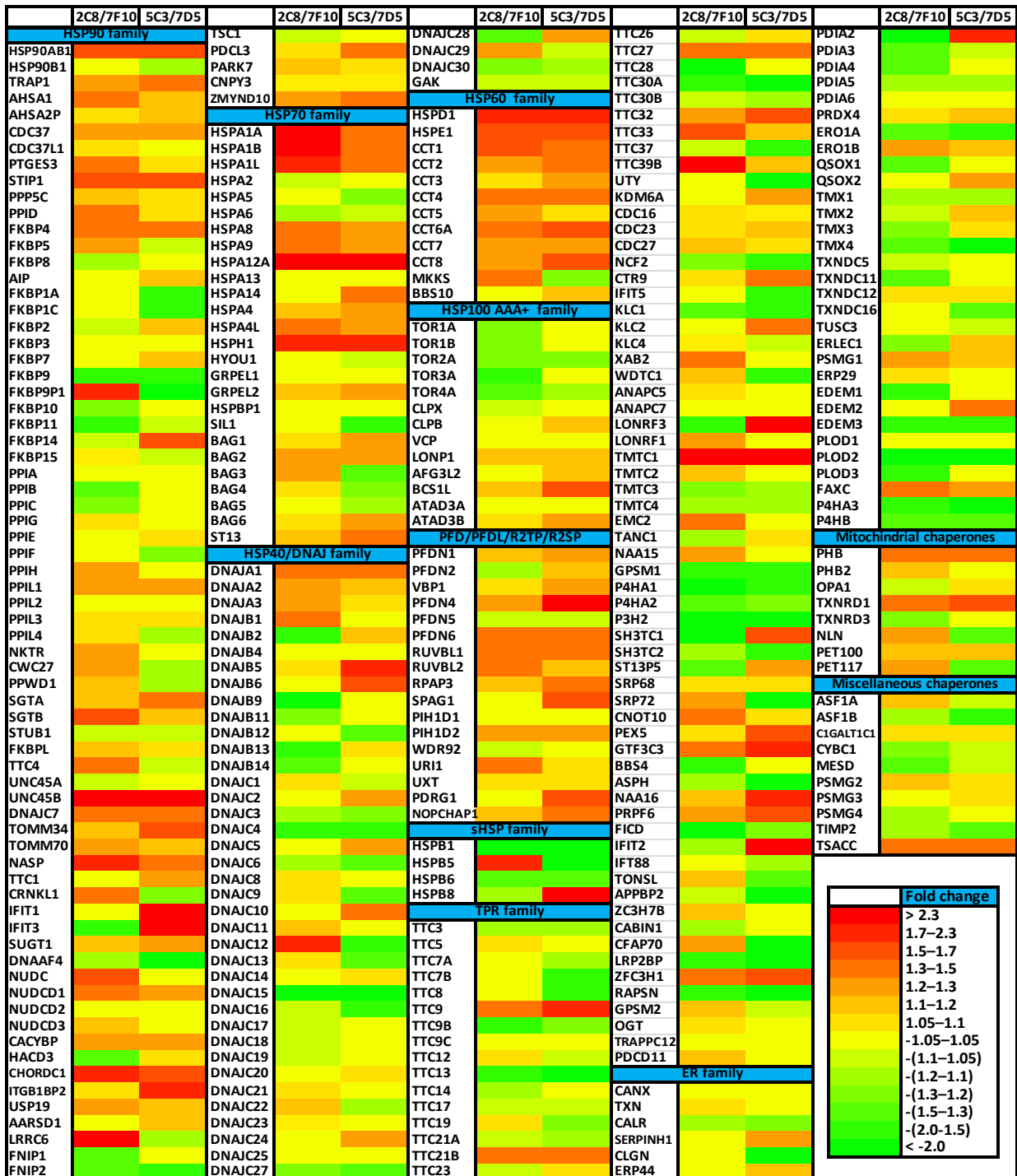
Knockout of the *HSP90AA1* gene encoding Hsp90 α in HT1080 human fibrosarcoma cells was accompanied by adaptation of the cellular chaperone machine to Hsp90 α loss. Adaptation included increased expression of Hsp90 β , key Hsp90 co-chaperones, chaperones and co-chaperones of the Hsp70/Hsp40 complex, components of the TRiC/CCT complex, prefoldins, prefoldin-like PFDL, R2TP, and R2SP chaperone complexes, as well as key mitochondrial chaperones and chaperonins.

Молекулярные шапероны, ко-шапероны и адаптерные белки формируют клеточный шапером — сложную и тонко регулируемую систему, обеспечивающую правильную укладку вновь синтезируемых белков и поддержание клеточного гомеостаза [1]. Клеточный шапером человека насчитывает более 350 генов. Белок теплового шока 90 (Hsp90) является ключевым компонентом клеточного шаперома, который, функционируя совместно с другими шаперонами (Hsp70, Hsp40) и ко-шаперонами (Hop, PPIase, p23, Aha1, Cdc37), выполняет важные функции «домашнего хозяйства», связанные с укладкой и стабилизацией белков, сборкой мультимолекулярных комплексов и деградацией белков [2]. Многие белки, фолдинг которых обеспечивает Hsp90, играют важную роль в онкогенезе, в связи с чем Hsp90 является перспективной молекулярной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов [3]. В клетке функционируют две цитоплазматические изоформы Hsp90, стресс-индуцибельная изоформа Hsp90 α и конститутивно экспрессируемая изоформа Hsp90 β [4]. На сегодняшний день специфическая функциональная роль двух цитоплазматических изоформ Hsp90 изучена крайне слабо.

Ранее, используя технологию CRISPR/Cas9, мы получили стабильные клоны клеток фибросаркомы человека HT1080 с биаллельным нокаутом гена *HSP90AA1*, кодирующего Hsp90 α (Hsp90 α -КО клоны). Нокаут гена *HSP90AA1* в клетках HT1080 практически не влиял на пролиферацию и миграцию клеток, а также на устойчивость клеток к тепловому шоку и окислительному стрессу. Таким образом, мы продемонстрировали, что изоформа Hsp90 α не является абсолютно необходимой в ряде базовых клеточных процессов в нормальных и стрессовых условиях. В Hsp90 α -КО клонах уровень Hsp90 β был повышен на 30–50 %, но общее количество Hsp90 в клетках было примерно в два раза ниже, чем в родительской линии HT1080 [5].

Для дальнейшего исследования адаптации клеточного шаперома Hsp90 α -КО клеток к потере Hsp90 α проведено секвенирование транскриптома Hsp90 α -КО клонов и анализ дифференциальной экспрессии генов, кодирующих белки клеточного шаперома. В клетках Hsp90 α -КО наблюдалась значительная активация экспрессии генов, кодирующих Hsp90 β (*HSP90AB1*) и критически важных ко-шаперонов Hsp90 — ANA1 (*AHSA1*), CDC37 (*CDC37*), P23 (*PTGES3*), а также некоторых других ко-шаперонов Hsp90. Наблюдалась повышенная экспрессия генов, кодирующих ключевые шапероны и ко-шапероны аппарата Hsp70/Hsp40, который тесно связан с Hsp90 шаперонной машиной: основных цитозольных Hsp70 (*HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA8*), HIP (*ST13*), тип 1 Hsp40 (*DNAJA1*, *DNAJA2* и *DNAJA3*) и HOP (*STIP1*), который объединяет Hsp90 и Hsp70/Hsp40

шаперонные машины. Кроме того, в значительной степени индуцировались гены, кодирующие CCT-шаперонины комплекса TRiC/CCT, префолдины (PFD), а также компоненты префолдиноподобных (PFDL), R2TP и R2SP шапероновых комплексов. Экспрессия ключевых митохондриальных шаперонов и шаперонинов (*TRAP1*, *HSPA9*, *HSPD1*, *HSPE1* и др.) также повышалась, в то время как экспрессия шаперонов и ко-шаперонов, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме, преимущественно подавлялась или оставалась неизменной. Дифференциальная экспрессия генов клеточного шаперома в Hsp90 α -КО клонах 5C3/7D5 и 2C8/7F10 представлена на рисунке.



Экспрессия генов клеточного шаперома в Hsp90 α -КО клонах 5C3/7D5 и 2C8/7F10. Цветовая шкала показывает величину и направленность изменения экспрессии генов (Fold Change). Зеленый цвет — более низкий уровень экспрессии, красный — более высокий уровень экспрессии, желтый — отсутствие изменения экспрессии

Полученные данные свидетельствуют, что адаптация клеточного шаперома при нокауте гена *HSP90AA1*, кодирующего Hsp90 α , в клетках HT1080 происходит за счет повышения экспрессии Hsp90 β , ключевых ко-шаперонов Hsp90, шаперонов и ко-шаперонов аппарата Hsp70/Hsp40, а также за счет индукции экспрессии компонентов комплекса TRiC, PFD и PFDL, комплексов шаперонов R2TP и R2SP и митохондриальных шаперонов.

Литература

1. Taipale M., Jarosz D. F., Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis, emerging mechanistic insights // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 11. P. 515–528.
2. Biebl M. M., Buchner J. Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 Machinery // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11(9). P. a034017.
3. Zou M., Bhatia A., Dong H., Jayaprakash P., Guo J., Sahu D., Hou Y., Tsen F., Tong C., O'Brien K., et al. Evolutionarily conserved dual lysine motif determines the non-chaperone function of secreted Hsp90alpha in tumour progression // *Oncogene.* 2017. V. 36(15). P. 2160–2171.
4. Maiti S., Picard D. Cytosolic Hsp90 Isoform-Specific Functions and Clinical Significance // *Biomolecules.* 2022. V. 12(9). P. 1166.
5. Petrenko V., Vrublevskaia V., Bystrova M., Masulis I., Kopylova E., Skarga Y., Zhmurina M., Morenkov O. Proliferation, migration, and resistance to oxidative and thermal stresses of HT1080 cells with knocked out genes encoding Hsp90 α and Hsp90 β // *BBRC.* 2023. V. 674. P. 62–68.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-357

**СОЗДАНИЕ ТАРГЕТНЫХ ГИБРИДНЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА M13
ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ТРАНСДУКЦИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА*****DEVELOPMENT M13 BACTERIOPHAGE-BASED TARGETED HYBRID VECTORS
FOR HUMAN GLIOBLASTOMA CELL SELECTIVE TRANSDUCTION**Г. О. Петров¹, В. С. Муханов^{1,2}, М. А. Дымова¹¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*G. O. Petrov¹, V. S. Mukhanov^{1,2}, M. A. Dymova¹¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*

✉ petrov.olegovich@gmail.com

Аннотация

Бактериофаги, вирусы бактерий, в настоящее время активно используются в качестве источника эффективных инструментов генной терапии онкологических заболеваний. Цель данной работы заключалась в создании таргетных гибридных векторов на основе нитчатого фага M13, способных обеспечить эффективную и селективную доставку трансгенов в клетки глиобластомы человека U-87 MG.

Abstract

Bacteriophages, bacterial viruses, are currently being used as source of effective gene therapy tools for cancer. The aim of this study was to develop targeted hybrid vectors based on filamentous phage M13, capable of efficient and selective delivery of transgenes into U-87 MG human glioblastoma cells.

Мультиформная Глиобластома, определяемая также как глиома IV степени злокачественности, представляет собой наиболее распространенную и агрессивную форму опухоли центральной нервной системы. Несмотря на текущие успехи в создании новейших методов характеристики и обнаружения глиобластомы, а также персонализацию традиционных терапевтических методов, медиана выживаемости пациентов, проходящих стандартный курс лечения данного онкологического заболевания составляет всего 15 месяцев [1]. Основными причинами такого неблагоприятного прогноза являются высокая резистентность глиобластомы к химио- и лучевой терапии и специфическая локализация опухоли, затрудняющая хирургическое вмешательство и проникновение химиотерапевтических препаратов через гематоэнцефалический барьер. В связи с этим в настоящее время ведется разработка более эффективных альтернативных подходов к лечению глиобластомы человека, одним из которых является генная терапия. В основе данного подхода лежит высокоточная доставка терапевтических генов, направленных на создание противоопухолевого иммунного ответа или достижение цитотоксических и опухоль-супрессорных эффектов в целевых клетках [2].

Ключевым фактором, определяющим эффективность генной терапии, является система доставки генетического материала в клетки опухоли, или вектор. В этом отношении, наиболее часто используемые в клинических испытаниях векторы на основе вирусов эукариот оказали значительное влияние на развитие генной терапии, поскольку данные инфекционные агенты демонстрируют стабильную и продолжительную экспрессию своих генов в хозяйских клетках [3]. В то же время высокая иммуногенность и естественный тропизм к клеткам млекопитающих затрудняют использование вирусов эукариот в качестве средств доставки терапевтических генов при их системном введении. Бактериофаги, эволюционно адаптированные к инфекции прокариот, в свою очередь, лишены указанных недостатков, что наряду с легкой модифицируемостью делает данные вирусы потенциальным источником более эффективных векторов генной терапии [4].

В 2006 году впервые была продемонстрирована возможность использования нитчатого фага M13 для селективной трансдукции клеток млекопитающих [5]. Отсутствие у бактериофага механизмов эффективной экспрессии собственных генов в клетках эукариот было компенсировано модификацией его генома, путем встройки цис-регуляторных элементов аденоассоциированного вируса человека. Мы использовали данную стратегию

* Работа поддержана в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121030200173-6.

© Г. О. Петров, В. С. Муханов, М. А. Дымова, 2023

для создания гибридных вирусных векторов, обеспечивающих высокоселективную трансдукцию клеток глиобластомы человека. В качестве опухоль-адресующих лигандов разрабатываемых фагов выступили отобранный ранее методом фагового дисплея пептид, обладающий сродством к клеткам глиобластомы человека U-87 MG, и пептид RGD4C, молекулярной мишенью которого является интегрин $\alpha_v\beta_3$, сверхэкспрессирующийся на поверхности опухолевых клеток. В ходе работы методами иммуноцитохимического анализа и флуоресцентной микроскопии нами продемонстрированы эффективность и селективность связывания полученных гибридных вирусных частиц с целевыми клетками, необходимые в дальнейшем для таргетной доставки терапевтических трансгенов.

Литература

1. Rončević A., Koruga N., Soldo Koruga A., Rončević R., Rotim T., Šimundić T., Kretić D., Perić M., Turk T., Štimac D. Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective // *Biomedicines*. 2023. V. 11(6): 1579.
2. Yamamoto M., Curiel D. T. Cancer Gene Therapy // *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2005. V. 4(4). P. 315–330.
3. Santiago-Ortiz J. L., Schaffer D. V. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy // *Journal of Controlled Release*. 2016. V. 240. P. 287–301.
4. Hosseini Z. Phage-Mediated Gene Therapy // *Current Gene Therapy*. 2017. V. 17(2). P. 120–126.
5. Hajitou A., Trepel M., Lilley C. E., Soghomonyan S., Alauddin M. M., Marini III F. C., Restel B. H., Ozawa M. G., Moya C. A., Rangel R., Sun Y., Zaoui K., Schmidt M., Kalle C., Weitzman M. D., Gelovani J. G., Pasqualini R., Arap W. A Hybrid Vector for Ligand-Directed Tumor Targeting and Molecular Imaging // *Cell*. 2006. V. 125(2). P. 385–398.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-358

**АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕМАТОРЕТИНАЛЬНОГО
И ГИППОКАМПАЛЬНОГО ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРОВ У КРЫС OXYS
ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ
И БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

**ESTIMATING FUNCTIONAL STATE OF THE BLOOD-RETINAL AND HIPPOCAMPAL
BLOOD-BRAIN BARRIERS IN OXYS RATS ALONG THE DEVELOPMENT
OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND ALZHEIMER'S DISEASE FEATURES**

Д. А. Пеунов, Д. В. Телегина, О. С. Кожевникова, Н. Г. Колосова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

D. A. Peunov, D. V. Telegina, O. S. Kozhevnikova, N. G. Kolosova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ peunov87@gmail.com

Аннотация

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) и болезнь Альцгеймера (БА) — нейродегенеративные болезни со спорной этиологией. Важную роль в их развитии может играть дисфункция гематоретинального (ГРБ) и гематоэнцефалического (ГЭБ) барьеров, образованных плотными контактами. В данной работе мы оценивали проницаемость ГРБ и ГЭБ гиппокампа, их функциональное состояние и содержание белков плотных контактов на модели преждевременного старения — крысах OXYS.

Abstract

Age-associated macular degeneration and Alzheimer's disease are neurodegenerative diseases with debatable etiology. Dysfunction of the blood-retinal and blood-brain barriers, which are formed by tight junctions, may be essential to the development of the pathologies. This work is dedicated to the estimation of blood-retinal and hippocampal blood-brain barriers' permeability and functional state, so as the content of tight junctional proteins.

Возраст — ведущий фактор риска ВМД и БА — основных нейродегенеративных заболеваний людей старше 60 лет, заболеваемость которыми растет на фоне увеличения продолжительности жизни. Ситуация осложняется сочетанном течением этих заболеваний — у людей с ВМД наблюдается высокая частота когнитивных нарушений, а патологические изменения глазного дна диагностируются у большинства больных БА [1]. Однако механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологический процесс, остаются неясными. Предполагается, что нарушение гомеостаза из-за изменения проницаемости ГРБ и ГЭБ барьеров может вносить существенный вклад в развитие ВМД и БА. Тем не менее информация об изменениях проницаемости этих барьеров с возрастом и при развитии ВМД и БА, в особенности в доклинический период, ограничена. Исследования проводили на линии крыс OXYS — модели преждевременного старения, проявлениями которого становится раннее развитие ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, и ключевых признаков БА. Исследовали изменения проницаемости ГЭБ и ГРБ и изменения уровня основных белков плотных контактов: окклюдина (Occludin), клаудина 5 (Cldn5) и белка плотных контактов 1 (Tjp1) в сетчатке и гиппокампе крыс OXYS и Вистар на разных стадиях развития ВМД и БА: когда признаки патологии отсутствуют (20 дней и 1,5 мес.), стадии манифестации (3–5 мес.) и прогрессии заболеваний (12 и 18 мес.)

In vivo проницаемость ГРБ, измеренная путём введения красителя Эванса синего, зависела от линии ($F_{1,51} = 15,4545$, $p < 0,001$), и у крыс OXYS была ниже, чем у крыс Вистар в 20 дней, 5 и 18 мес. ($p < 0,05$). К 18 мес. проницаемость ГРБ изменялась, снижаясь у крыс обеих линий ($p < 0,05$). Проницаемость ГЭБ гиппокампа зависела от возраста ($F_{3,51} = 4,7940$, $p < 0,01$), но апостериорный анализ не выявил значимых различий.

Содержание Cldn5 в сетчатке крыс зависело от линии OXYS ($F_{1,24} = 4,3786$, $p < 0,05$), однако апостериорный анализ не выявил достоверных различий. Уровень Occludin в сетчатке крыс OXYS был выше по сравнению с крысами Вистар ($p < 0,05$) в возрасте 18 мес., что обусловлено снижением его содержания у крыс Вистар с 20 дней к 18 мес. ($p < 0,05$). Содержанию белка Tjp1 в сетчатке снижалось с возраста 20 дней до 3 мес. у крыс обеих линий, а с возраста 3 до 18 мес. только у крыс Вистар ($p < 0,05$). В гиппокампе крыс OXYS уровень Occludin зависел от линии ($F_{1,46} = 5,401$, $p < 0,05$) и был ниже у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар в возрасте 1,5 мес.

Анализ данных РНК-секвенирования сетчатки [2, 3] и гиппокампа [4] 20-дневных, 3-5- и 18-мес. крыс OXYS и Вистар показал, что изменения сигнального пути плотных контактов (KEGG: rno04530) обнаружены с возраста 20 дней до 3-5 мес. у крыс обеих линий (FDR<0.05) в обеих тканях и с возраста 5 до 18 мес. в гиппокампе крыс OXYS (FDR<0.05). Однако мы не выявили значимого обогащения дифференциально экспрессирующихся генов сигнального пути плотных контактов между линиями ни в гиппокампе ни в сетчатке.

Полученные результаты указывают на то, что нарушение функций ГРБ и ГЭБ может влиять на развитие БА и ВМД. То что проявление признаков БА сопровождается небольшими отклонениями функций плотных контактов на преклинической стадии и стадии прогрессии, но не повышением его проницаемости может свидетельствовать об их влиянии на инициацию патологических процессов и малом влиянии на ее развитие. Транскрипционный профиль генов плотных контактов и снижение проницаемости ГРБ в сетчатке крыс OXYS соответствуют клинико-морфологическому типу дегенерации сетчатки по сухому типу. В то же время мы получили возможные подтверждения влияния ранних нарушений функции плотных контактов и продолжительного изменения их проницаемости на развитие сухой формы ВМД.

Литература

1. Wen L.-Y. et al. Increased risk of Alzheimer's disease among patients with age-related macular degeneration: A nationwide population-based study // PLoS One. 2021.V. 16(5) P. e0250440.
2. Telegina D.V. et al. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy // Cell Cycle. 2015.V. 14(22) P. 3544–3556.
3. Kozhevnikova O. S. et al. Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy // Cell Cycle. 2013.V. 12(11) P. 1745–1761.
4. Stefanova N.A., Kolosova N.G. The Rat Brain Transcriptome: From Infancy to Aging and Sporadic Alzheimer's Disease-like Pathology // Int J Mol Sci. 2023.V. 24(2) P. 1462.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-359

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ TWEEN-20 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ CELL SELEX К РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЕ C-KIT***EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF USING TWEEN-20 TO OBTAIN DNA-APTAMERS USING CELL SELEX TO RECEPTOR TYROSINE KINASE C-KIT**

С. А. Поляков, В. Е. Кузнецова, Т. Д. Лебедев, В. Е. Шершов, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

S. A. Polyakov, V. E. Kuznetsova, T. D. Lebedev, V. E. Shershov, A. V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ kuzneimb@gmail.ru

Аннотация

Определена степень влияния Tween-20 на жизнеспособность модифицированных клеток крови мыши с гиперэкспрессией человеческой рецепторной тирозинкиназы c-KIT.

Abstract

The degree of influence of Tween-20 on the viability of modified mouse blood cells with overexpression of human receptor tyrosine kinase c-KIT was determined.

Ген КИТ является геном, кодирующим трансмембранный белок — рецепторную тирозинкиназу, который участвует в таких процессах, как рост, деление, миграция и поддержание жизнеспособности клеток организма. Гиперэкспрессия рецепторной тирозинкиназы КИТ характерна для злокачественных заболеваний разных типов: лейкозов, нейробластом, гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО), мастоцитом и меланом. Контроль уровня экспрессии данного белка, экспонированного на поверхности злокачественных клеток человека, а также возможность его блокирования высоко-аффинными лигандами, является важной задачей молекулярной онкологии.

Аптамеры, представляющие собой короткие синтетические одностранные ДНК или РНК, благодаря уникальной трехмерной конформации, способны с высокой степенью аффинности и селективности связываться с заданным клеточным рецептором и могут быть использованы как аналоги антител. Не существует универсальной технологии селекции, подходящей для любых объектов, поэтому для получения аптамеров требуется постоянная оптимизация.

Для проведения циклов селекции отобраны модифицированные клетки крови мыши FDC-P1 с гиперэкспрессией человеческого гена КИТ (FDC-P1-КИТ). Для аналитических целей необходимо определить белок не в свободной форме, а находящийся в нативном состоянии, конформацию которого определяет липидный бислой мембраны.

Селекция аптамеров представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий чередование множества циклов. Присутствие мертвых клеток и клеточного мусора еще больше усложняет селекцию из-за их высокого неспецифического сродства к одноцепочечной ДНК. Анализ с помощью флуоресцентной микроскопии показал, что вырожденная библиотека ДНК-аптамеров продемонстрировала неспецифическое поглощение в мертвых клетках с нарушенной целостностью мембран (рис. 1). Добавление избытка двухцепочечной ДНК, дрожжевой тРНК, синтетической маскирующей ДНК в качестве блокирующих агентов, использование сыворотки крупного рогатого скота не оказало существенного влияния на неспецифическую сорбцию аптамеров. Интенсивность сигнала флуоресценции связывания аптамеров с мертвыми клетками по сравнению с эквивалентными популяциями живых клеток различалась более, чем в 100 раз.

Удаление мертвых клеток в процессе селекции является затруднительной задачей, приводящей к потере единичных последовательностей вырожденной ДНК-библиотеки. Одним из способов снижения неспецифической сорбции в процессе селекции аптамеров (при использовании в качестве мишеней бактериальных клеток) является применение неионных поверхностно-активных веществ. Неионные ПАВ в низких концентрациях могут

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00549.

© С. А. Поляков, В. Е. Кузнецова, Т. Д. Лебедев, В. Е. Шершов, А. В. Чудинов, 2023

встраиваться в липидный бислой, образуя полярные дефекты, которые изменяют физические свойства клеточных мембран и приводят к ее обратимой солюбилизации.

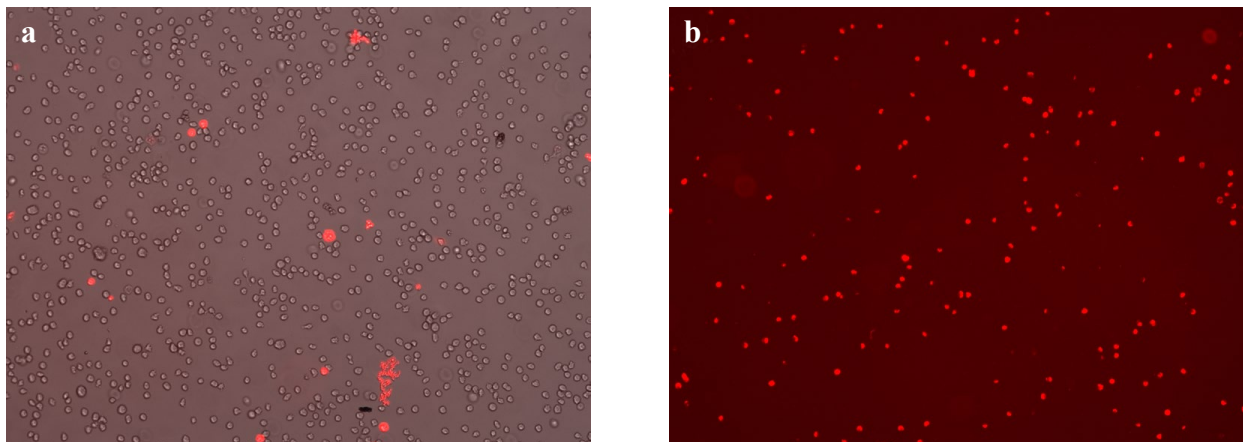


Рис. 1. Неспецифическая сорбция на примере проведения одного раунда селекции (а) и постселекционной обработки клеток при нагревании в буферном растворе (b)

На примере клеток крови мыши FDC-P1 методом флуоресцентной микроскопии определена степень влияния Tween-20 на жизнеспособность клеток (рис. 2). Показано, что применение Tween-20 в диапазоне концентраций 0,01–0,1 % оказывает значительную цитотоксичность как в клеточных линиях с гиперэкспрессией с-KIT на поверхности, так и без нее после 30-минутного воздействия в составе Selex буфера (фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко с CaCl_2 и MgCl_2). Tween-20 в концентрациях 0.01 % не токсичен для всех клеток, демонстрируя выживаемость клеток > 95 %. Эффективность окрашивания KIT-позитивных клеток FDC-P1 библиотекой олигонуклеотидов после 10 цикла селекции оказалась одинаковой как в отсутствие Tween-20, так и при его концентрации 0.01 %. При этом неспецифическая сорбция аптамеров снизилась, что позволяет сделать вывод о возможности применения Tween-20 в последующих раундах селекции.

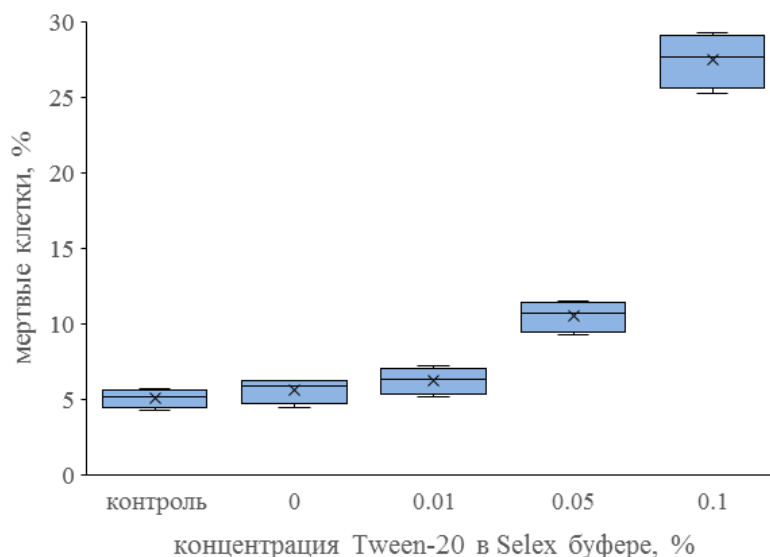


Рис. 2. Оценка влияния Tween-20 на жизнеспособность клеток FDC-P1 при помощи метода флуоресцентной микроскопии (краситель DAPI)

Далее оценивали уровень представленности рецептора KIT на поверхности клеточных линий с помощью проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки инкубировали с флуоресцентно-мечеными антителами против внеклеточного домена белка KIT. Анализ подтвердил высокий уровень экспрессии и представленности рецептора KIT в клетках FDC-P1 как с добавлением 0.01 % Tween-20, так и без него.

Таким образом, несмотря на растущее число публикаций по созданию новых способов селекции и их оптимизации, разработка технологий создания аптамеров с желаемыми характеристиками для различных мишеней все еще является актуальной задачей.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-360

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ И ПОЛИКЕТИДОВ****DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR SCREENING BACTERIA PRODUCING
BIOLOGICALLY ACTIVE NONRIBOSOMAL PEPTIDES AND POLYKETIDES**

К. И. Потешкина, А. М. Стенкова

Институт наук о жизни и биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

K. I. Poteshkina, A. M. Stenkova

Institute of Life Sciences and Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok

✉ poteshkina.ki@dvvfu.ru

Аннотация

Важным направлением в науке и медицине является изучение биологически активных соединений, продуцируемых морскими микроорганизмами, благодаря которому происходит поиск новых перспективных лекарственных средств. Данное исследование направлено на скрининг коллекции морских микроорганизмов, полученных из беспозвоночных залива Восток Приморского края на носительство биохимических генных кластеров нерибосомных пептидсинтетаз (НРПС) и поликетидсинтаз (ПКС).

Abstract

An important direction in science and medicine is the study of biologically active compounds produced by marine microorganisms, due to which there is a search for new promising drugs. This study is aimed at screening a collection of marine microorganisms obtained from invertebrates from the Vostok Bay of Primorsky Krai for the presence of biochemical gene clusters of nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS).

Морские микроорганизмы являются перспективным источником большого количества биологически активных метаболитов. Это связано с тем, что морская экосистема уникальна по своему разнообразию условий обитания, что делает ее неисчерпаемым ресурсом биологически активных природных веществ. Особенно интересны нерибосомные пептиды и поликетиды, обладающие широким спектром биологических свойств. Нерибосомные пептиды представляют собой вторичные метаболиты с разнообразными свойствами, например, токсины, сидерофоры, пигменты или антибиотики. В отличие от других белков, их биосинтез не зависит от рибосом. Нерибосомные пептиды синтезируются большими ферментативными комплексами — нерибосомными пептидсинтетазами (NRPS) [1]. Пептиды нерибосомного синтеза обладают в основном циклическими структурами и невысоким молекулярным весом. В состав этих молекул входят как протеиногенные, так и непротеиногенные аминокислоты, а также непептидные соединения [3]. Эти факторы способствуют разнообразию синтезируемых структур и их биологическим свойствам. Некоторые уже имеющиеся на рынке препараты с антибактериальным и противоопухолевым действием представляют собой нерибосомные пептиды или поликетиды.

Целью данного исследования является скрининг коллекции морских микроорганизмов, полученных из беспозвоночных залива Восток Приморского края на носительство биохимических генных кластеров нерибосомных пептидсинтетаз (НРПС) и поликетидсинтаз (ПКС).

В работе использовали штаммы морских бактерий, выделенные в течение 2021 г из различных морских объектов. Для выделения геномной ДНК из бактерий использовали набор реагентов «ДНК-сорб-АМ». Дизайн праймеров для детекции НРПС был выполнен на основе консенсусной последовательности аденилирующего домена девяти последовательностей НРПС, полученных из GenBank. Праймеры для детекции ПКС II типа были созданы с использованием того же подхода на основе выравнивания 18 генов KSa. Ожидаемая длина фрагментов составляла 480-620 для НРПС и 350-510 п.н. для ПКС II типа. Детекцию НРПС и ПКС проводили методом ПЦР с разработанными праймерами. Эффективность ПЦР и длину фрагментов оценивали методом электрофореза в агарозном геле.

В результате была разработана тест-система на основе ПЦР для быстрого скрининга изолятов морских микроорганизмов на содержание генных кластеров поликетид синтетаз второго типа (ПКС II) и синтетаз нерибосомных пептидов (НРПС) — основных источников низкомолекулярных биологически активных метаболитов

с антибактериальной и противоопухолевой активностью. Из 208 штаммов у 39 (18,7 %) выявлены гены НРПС и у 16 (7,7 %) — ПКС II. Среди 34 штаммов с антибактериальной активностью носительство генов НРПС/ПКС составило 38 % (13 из 34), что возможно свидетельствует о продукции веществ других классов, например, бактериоцинов или поликетидов III-го класса, или наличии новых дивергентных генных кластеров НРПС/ПКС. В настоящее время на рынке имеется большое количество соединений нерибосомного синтеза. Так, даптомицин, выделенный из *Streptomyces roseosporus*, представляет собой антибиотик, применяемый для лечения инфекций, вызванных грамм-положительными бактериями [1]. Бацитрацин, производимый штаммами бактерии *Bacillus subtilis*, ингибирует синтез клеточной оболочки бактерий. Проявляет активность против грамположительных микроорганизмов, таких как бета-гемолитические стрептококки, стафилококки, и некоторых грамотрицательных патогенов [2].

Полученные результаты подтверждают, что данный метод помогает с высокой эффективностью выявлять потенциальных продуцентов биологически активных нерибосомных пептидов и поликетидов.

Литература

1. Agrawal S. et al. Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential // *Frontiers in pharmacology*. 2017. Т. 8. С. 828.
2. Martínez-Núñez M.A., López V.E.L. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry // *Sustainable Chemical Processes*. 2016. Т. 4. С. 1–8.
3. Winn M. et al. Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines // *Natural product reports*. — 2016. — Т. 33. № 2. С. 317–347.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-361

**СРАВНЕНИЕ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОРТОЛОГОВ CRISPR CAS12A
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ****COMPARISON OF COLLATERAL ACTIVITY OF CRISPR CS12A ORTHOLOGS
FOR THE DEVELOPMENT OF NOVEL DIAGNOSTIC SYSTEMS**А. С. Потысьева, А. Н. Арсениев, П. А. Селькова, А. А. Васильева,
А. С. Мельников, П. Ю. Сердобинцев, М. А. Ходорковский*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*

A. S. Potyseva, A. N. Arseniev, P. A. Selkova, A. A. Vasilieva, A. S. Melnikov, P. Yu. Serdobintsev, M. A. Khodorkovskii

Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University

✉ alina.potyseva@yandex.ru

Аннотация

CRISPR/Cas системы — это системы защиты бактерий и архей. В настоящее время охарактеризовано несколько классов этих систем. Помимо основной направленной нуклеазной активности системы V типа II класса, обладают специфичной коллатеральной активностью, которая легла в основу нового типа диагностических систем. В результате работы были получены данные характеризующие коллатеральную активность двух ортологов данного класса и продемонстрировано, что система CRISPR ScCas12a обладает большей специфичностью по сравнению с AsCas12a.

Abstract

CRISPR/Cas systems are defense systems for bacteria and archaea. Several classes of these systems have now been characterized. In addition to the main directed nuclease activity, type II class V systems possess specific collateral activity, which formed the basis for a new type of diagnostic systems. In the result of this work we obtained data characterizing the collateral activity of two orthologs of this class and demonstrated that the CRISPR system ScCas12a has greater specificity compared to AsCas12a.

CRISPR/Cas системы — это системы защиты бактерий и архей, состоящие, как правило, из гидовой РНК, направляющей эффекторный белок на специфическую последовательность ДНК и непосредственно Cas-нуклеазы (белка, осуществляющего разрезание чужеродного генетического материала). В настоящее время охарактеризовано несколько классов этих систем, каждый из которых в свою очередь подразделяется на несколько типов. Помимо основной направленной нуклеазной активности системы V типа II класса, обладают специфичной коллатеральной активностью. Она заключается в том, что белки данного класса способны после целевого разрезания мишени, производить множественное расщепление однонитевых нецелевых фрагментов ДНК. Данная активность легла в основу нового типа диагностических систем, позволяющих детектировать вирусные и бактериальные инфекции в полевых условиях.

Целью настоящей работы было произвести тестирование систем ортологов AsCas12a и ScCas12a на различных ДНК мишенях с мутациями в области PAM. Данные нуклеазы имеют схожие гидовые РНК и последовательности PAM: 5'-TTTV-3' для AsCas12a и 5'-YTTN-3' для ScCas12a соответственно. Ранее было показано, что ScCas12a проявляет большую специфичность в сравнении с AsCas12a. Было выявлено, что замена во 2 либо 3 позиции в последовательности PAM приводит к сильному ингибированию коллатеральной активности белка ScCas12a. В рамках данной работы была протестирована возможность детекции AsCas12a и ScCas12a одиночных нуклеотидных мутаций в ДНК мишенях полученных на основе данных о различных аминокислотных заменах встречающихся в штаммах SARS-CoV-2. Для этого были проанализированы несколько мутаций в аминокислотной последовательности различных функциональных доменов гена S. Замены подбирались так, чтобы они выпадали непосредственно на последовательность PAM, находящуюся перед мишенью. Далее были получены соответствующие гидовые РНК и был проведен ряд экспериментов по тестированию нуклеазной и коллатеральной активности белков. Визуализация коллатеральной активности проводилась с помощью мультимодального ридера и специальных флуоресцентных зондов.

Полученные данные свидетельствуют о большей специфичности ScCas12a, который способен выявлять даже одиночные мутации аминокислот в различных штаммах SARS-CoV-2. Эти данные могут быть использованы в различных системах детекции других патогенных вирусов и бактерий, что в свою очередь может сильно упростить широкоприменяемые сейчас методы анализа образцов, такие как ПЦР, ведь в случае детекции при помощи CRISPR/Cas систем не требуется применение сложного оборудования и большие временные затраты.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-362

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ NMDA И AMPA РЕЦЕПТОРОВ
В ДОРСАЛЬНОМ ГИППОКАМПЕ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП
В ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМ СОСТОЯНИИ***

**INVESTIGATION OF NMDA AND AMPA RECEPTOR GENE EXPRESSION
IN THE DORSAL HIPPOCAMPUS OF RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS
IN A DEPRESSIVE-LIKE CONDITION**

Е. С. Прокопенко^{1,2}, О. В. Надей¹, Н. И. Агалакова¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*

²*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)*

E. S. Prokopenko^{1,2}, O. V. Nadei¹, N. I. Agalakova¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg*

²*Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University)*

✉ prokopenko.ekaterina01@mail.ru

Аннотация

В работе проведён сравнительный анализ уровней экспрессии генов, кодирующих различные субъединицы AMPA и NMDA-рецепторов в дорсальном гиппокампе крыс разных возрастных групп в депрессивно-подобном состоянии (ДПС). В экспериментальных группах животных были выявлены изменения уровней экспрессии генов субъединиц этих рецепторов, указывающие на различные механизмы развития ДПС в разном возрасте.

Abstract

The work presents a comparative analysis of the expression levels of genes encoding different subunits of AMPA and NMDA receptors in the dorsal hippocampus of rats at different ages in a depressive-like condition (DLC). In experimental groups of rats, changes in expression levels of the genes of these receptors subunits were detected, indicating different mechanisms of DLC development at different ages.

В последние годы депрессивные расстройства становятся всё более серьёзной проблемой. По оценкам всемирной организации здравоохранения во всем мире от депрессии страдают более 300 миллионов человек [1]. Депрессивное расстройство часто сопровождается рядом других патологических изменений, в частности, является фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Однако до сих пор не существует понимания нейробиологических механизмов развития этого заболевания, а также его молекулярных маркеров, которые могли бы служить основой для разработки новых видов эффективной терапии.

Одной из лидирующих на данный момент гипотез патогенеза депрессивных расстройств является гипотеза дисфункции глутаматергической системы, согласно которой стрессовые факторы вызывают чрезмерную активность NMDA рецепторов как на клеточном уровне, так и на уровне отдельных участков мозга. Дисфункция NMDA рецепторов приводит к региональному нарушению кортико-лимбических цепей и дофаминергических путей передачи сигналов вознаграждения, нарушая нормальные нейробиологические функции, а также способна приводить к эксайтотоксической гибели клеток мозга [3]. AMPA-рецепторы участвуют в этих процессах, обеспечивая изменение мембранного потенциала для открытия канала NMDA рецептора, а их функциональная активность напрямую зависит от субъединичного состава [4]. Однако мало что известно об изменении экспрессии субъединиц этих рецепторов при депрессивном расстройстве.

Поэтому целью данной работы было оценить изменение экспрессии генов, кодирующих субъединицы NMDA и AMPA рецепторов, в дорсальном гиппокампе крыс разных возрастных групп при развитии депрессивно-подобного состояния (ДПС).

Исследование проводилось на самцах крыс Wistar возрастом 3, 10 и 20 месяцев. Для моделирования ДПС животные подвергались процедуре хронического непредсказуемого стресса (ХНС), включающей предъявление чередующихся коротких и длительных умеренных стрессовых стимулов, на протяжении 5 недель. Для оценки развития ДПС проводили тест предпочтения сахарозы и поведенческие тесты (тест «открытое поле» и тест при-

* Работа выполнена в рамках гос. задания ИЭФБ РАН (075-00967-23-00).

© Е. С. Прокопенко, О. В. Надей, Н. И. Агалакова, 2023

нудительного плавания). Изменения экспрессии генов субъединиц AMPA и NMDA рецепторов в дорсальном гиппокампе крыс оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

По результатам поведенческих тестов к концу эксперимента у животных развивалась ангедония и состояние «поведенческого отчаяния», что указывало на развитие ДПС. В группе 10-месячных крыс достоверно снижалась экспрессия генов *Grin1* и *Grin2a*, кодирующих субъединицы GluN1 и GluN2A NMDA рецепторов. Поскольку субъединица GluN1 NMDA рецепторов является облигатной, наблюдаемое снижение экспрессии генов может свидетельствовать как о снижении количества GluN1/GluN2A, так и об общем снижении содержания NMDA рецепторов в клетках дорсального гиппокампа этой возрастной группы. Также в группе 10-месячных крыс выявлено достоверное снижение уровня экспрессии гена *Gria3*, кодирующего субъединицу GluA3 AMPA рецепторов. В группе 20-месячных крыс обнаружено достоверное снижение экспрессии гена *Gria2*.

Таким образом, при развитии ДПС в дорсальном гиппокампе крыс разного возраста наблюдались различные изменения экспрессии генов субъединиц NMDA и AMPA рецепторов, что указывает на изменения субъединичного состава этих рецепторов. Такие отличия могут свидетельствовать о различных механизмах, лежащих в основе развития ДПС в разном возрасте.

Литература

1. Global trends in the prevalence and incidence of depression: a systematic review and meta-analysis / D. Moreno-Agostino, Y. T. Wu, C. Daskalopoulou [et al.] // *Journal of affective disorders*. 2021. V. 281. P. 23–243.
2. Depression as a Risk Factor for Incident Ischemic Stroke Among HIV-Positive Veterans in the Veterans Aging Cohort Study / J. J. Sico, K. So-Armah, S. K. Gupta [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. 2021. V. 10. № 13. e017637.
3. Kuo, C. Y. Molecular basis of late-life depression / C. Y. Kuo, C. H. Lin, H. Y. Lane // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. № 14. P. 7421.
4. N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction as a potential contributor to the progression and manifestation of many neurological disorders / B. Dong, Y. Yue, H. Dong [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2023. V. 16. P. 1174738.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-363

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ЛАНДШАФТА РАКА ЯЗЫКА У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ***IMMUNE LANDSCAPE FEATURES OF TONGUE CANCER IN YOUNG ADULTS**Е. А. Простакишина, М. Р. Патышева, Е. С. Колегова, А. А. Хозяинова, М. Е. Меняйло,
И. В. Ларионова, И. К. Федорова, Д. Е. Кульбакин, Е. Л. Чойнзонов, Е. В. Денисов*Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН*E. A. Prostakishina, M. R. Patysheva, E. S. Kolegova, A. A. Khozyainova, M. E. Menyailo,
I. V. Larionova, I. K. Fedorova, D. E. Kulbakin, E. L. Choinzonov, E. V. Denisov*Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS*

✉ elprostakishina@yandex.ru

Аннотация

В нашей работе были исследованы особенности иммунного ландшафта пациентов с раком языка моложе 45 лет с применением технологии пространственной транскриптомики на уровне единичных клеток. В ходе исследования выявлено, что рак языка у молодых пациентов характеризуется иммуносупрессией.

Abstract

In our work, we investigated the immune landscape features of patients younger than 45 years of age with tongue cancer using spatial transcriptomics technology at the single-cell level. The study revealed that tongue cancer in young adults is characterized by immunosuppression.

Рак языка (РЯ) характеризуется агрессивным течением и высоким риском рецидивирования [1]. Изначально РЯ считался болезнью людей старше 60 лет, однако частота встречаемости РЯ в раннем возрасте, особенно у женщин, растет с каждым годом [2]. Иммунная система является важным участником в патогенезе злокачественных новообразований ротовой полости [3]. Однако, имеющиеся на данный момент исследования патогенеза РЯ молодых пациентов единичны, а поиск значимых популяций иммунных клеток сосредоточен не более чем на 2-3 маркерах [4]. Изучение роли иммунной системы в патогенезе РЯ пациентов молодого возраста требует исследований с применением мультипараметрического анализа микроокружения опухоли.

Цель исследования — исследование особенностей иммунного ландшафта РЯ пациентов моложе 45 лет.

Материалы и методы

В работе было исследовано 9 пациентов с РЯ стадии T2-3N0-1M0. Пациенты были разделены на две группы: моложе (n=5) и старше 45 лет (n=4). В 4 образцах опухоли языка, полученных от молодых пациентов, были исследованы срезы парафиновых блоков. В 1 образце опухоли языка от молодого пациента и 4 образцах от возрастных пациентов были исследованы срезы, полученные из замороженных тканей опухоли. Исследование проводилось с помощью технологии пространственной транскриптомики единичных клеток с использованием платформы Visium 10x (10x Genomics, США). Секвенирование образцов из парафиновых срезов проводилось на приборе GenoLab M (GeneMind Biosciences, Китай), секвенирование свежемороженых образцов — на Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, США). Интеграция данных была проведена с помощью пакета программ Harmony.

Результаты

Микроокружение РЯ молодых пациентов по сравнению с возрастными обогатено опухоль-ассоциированными макрофагами (ОАМ), что представлено гиперэкспрессирующимися генами *SERPINB2*, *LYZ* и *OSM*, и супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), представленными генами с повышенной экспрессией *FCGRB3* и *PFKFB3*, которые обладают иммуносупрессивными и проопухолевыми свойствами. При этом в микроокружении РЯ наблюдается снижение экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости (*HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* и *HLA-C*) и маркеров Т-клеток (*LY6L*, *TRBC2* и *TRBC1*), играющих важную роль в иммунном ответе

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-15-00308.

© Е. А. Простакишина, М. Р. Патышева, Е. С. Колегова, А. А. Хозяинова, М. Е. Меняйло, И. В. Ларионова, И. К. Федорова, Д. Е. Кульбакин, Е. Л. Чойнзонов, Е. В. Денисов, 2023

и в антигенной презентации, и, повышение экспрессии маркеров иммуноглобулинов (*IGHG2*, *IGHG1*, *IGLC1* и *IGKV4-1*). Также определено, что граница опухоли при РЯ у пациентов молодого возраста инфильтрована плазматическими клетками, обогащенными генами иммуноглобулинов (*IGHG2*, *IGHG1*, *IGLC1*, *IGKV4-1*, *JCHAIN*), и лимфоцитами (*TRBC1*, *TRBC2* и *IL7R*), агрегирующимися в третичные лимфоидные структуры. К тому же граница нормальной ткани и опухолевой инвазии была обогащена маркерами макрофагов: *CD68*, *SERPINB2* и *OSM*.

Вывод

Таким образом, РЯ у молодых пациентов характеризуется выраженной иммуносупрессией, характеризующейся опухоль-ассоциированными макрофагами и скоплениями плазматических клеток и лимфоцитов, организованных в третичные лимфоидные структуры на инвазивном крае опухоли, что подтверждает агрессивность заболевания по сравнению с возрастными пациентами.

Литература

1. Bagan J., Sarrion G., Jimenez Y. Oral cancer: Clinical features // *Oral Oncology*. 2010. V. 46(6). P. 414–417.
2. Dos Santos Costa S. F., Brennan P. A., Gomez R. S. et al. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients? // *Journal of oral pathology & medicine*. 2018. V. 47(6). P. 541–546.
3. Wondergem, N.E., Nauta, I.H., Muijlwijk, T. et al. The Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: on Subsets and Subsites // *Current Oncology Reports*. 2020. V. 81.
4. Kolegova E. S., Patysheva M. R., Larionova I. V. et al. Early-onset oral cancer as a clinical entity: aetiology and pathogenesis // *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2022. V. 51(12). P. 1497–1509.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-364

ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕХНОЛОГИИ «КАРАНАХАН» И *IN SITU* ВАКЦИНАЦИИ, ОБЪЕДИНЕННЫХ В ОДИН ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ ***INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF “KARANAHAN” TECHNOLOGY AND *IN SITU* VACCINATION COMBINED INTO ONE THERAPEUTIC REGIMEN**

В. С. Рузанова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

V. S. Ruzanova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ v.ruzanova.s@yandex.ru

Аннотация

Работа изучает возможность объединения нескольких противоопухолевых технологий в единую терапевтическую платформу при лечении злокачественных новообразований. В основе лежит технология «Каранахан», в результате применения которой происходит эрадикация стволовых иницирующих опухолевых клеток. В качестве синергичной технологии была выбрана *in situ* вакцинация, представляющая собой процедуру активации иммунитета при локальных инъекциях агентов.

Abstract

The work investigates the possibility of combining several antitumor technologies into a single therapeutic platform for the treatment of malignant neoplasms. It is based on the “Karanahan” technology, which results in the eradication of stem initiating tumor cells. *In situ* vaccination was chosen as a synergistic technology, which is a procedure for activating immunity with local injections of agents.

Настоящая работа посвящена изучению возможности объединения нескольких современных противоопухолевых технологий в единую терапевтическую платформу при лечении злокачественных новообразований. Современная парадигма предполагает, что ключом к успешной терапии злокачественных новообразований является учет временной динамики молекулярных событий во всем организме, а при иммунотерапии рака основополагающим является индивидуальный иммунный статус организма. Такое новое представление легло в основу технологий, основанных на хронометрической доставке терапевтических агентов к опухоли в зависимости от особенностей опухолевых клеток, а также от иммунного статуса организма. Наиболее яркими из них являются *in situ* вакцинация и метрономная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом (ММХТ ЦФ). Основной особенностью указанных подходов является их независимость от конкретной мишени или молекулы. В результате их применения индуцируется интегральный противоопухолевый иммунитет и разрушается проопухолевая активность опухоль-ассоциированной стромы (ОАС). Однако использование указанных технологий не приводит к таргетной элиминации стволовых опухолевых клеток и масштабному апоптозу опухолевых клеток.

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН был разработан подход, получивший название «Каранахан», в результате применения которого происходит эрадикация стволовых иницирующих опухолевых клеток и индукция масштабного апоптоза коммитированных опухолевых клеток. Этот подход, так же, как и предыдущие техники, имеет хронометрический характер и состоит из привязанного к репаративному и клеточному циклам конкретной опухоли введения цитостатика циклофосфана (ЦФ) и сложноразнокомпозиционного препарата на основе ДНК.

Известно, что *in situ* вакцинация и метрономная химиотерапия наиболее эффективны при лечении иммуногенных опухолей. В то же время, противоопухолевое действие технологии «Каранахан» не зависит от иммуногенности опухоли.

Было показано, что *in situ* вакцинация, ММХТ ЦФ и технология «Каранахан» имеют общие характерные черты воздействия на клетки. Общими чертами химиотерапии на основе ЦФ при ММХТ и технологии «Каранахан» являются сроки и дозы введения цитостатических препаратов, которые приводят к реполяризации ОАС и регрессии опухоли. При этом ММХТ ЦФ представляет собой составную часть технологии «Каранахан». Тех-

* Работа выполнена при поддержке И.Н. Зайцевой, ООО «Эс.Лаб Диагностика» и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации через Институт цитологии и генетики СО РАН (Государственный бюджетный проект № FWNR-2022-0016).

нология «Каранахан» и *in situ* вакцинация обладают схожей терапевтической процедурой. В обоих подходах используются препараты на основе ДНК (CpG и сложнокомпозиционный препарат на основе ДНК), имеющие одну и ту же клеточную мишень (антигенпрезентирующие дендритные клетки). Это означает, что при объединении в один терапевтический режим *in situ* вакцинации и технологии «Каранахан», принцип *in situ* вакцинации будет синергично и аддитивно усиливать вектор противоопухолевого иммунного ответа, индуцированного обработкой по технологии «Каранахан».

В настоящей работе на модели слабоиммуногенной карциномы легкого Льюиса была осуществлена попытка объединения в единый подход *in situ* вакцинации активатором макрофагов GcMAF и технологии «Каранахан». На начальном этапе исследования были определены основные параметры технологии «Каранахан» на выбранной модели и показана противоопухолевая эффективность технологии. При введении в терапию препарата GcMAF был обнаружен синергичный аддитивный противоопухолевый эффект. В опухоли статистически значимо снижается количество CD11b+Ly-6C⁺ клеток, которые являются супрессорами противоопухолевого иммунитета, и практически полностью исчезают Т — регуляторные клетки. Одновременно увеличивается количество цитотоксических лимфоцитов в периферической крови и натуральных киллеров в периферической крови и в селезенке. В опухолевом сайте происходит ингибирование синтеза мРНК супрессоров TGF β и ARG1 и активируется синтез мРНК NOS2. Полученные данные свидетельствуют, что выявленный синергичный аддитивный противоопухолевый эффект связан с M1 репрограммированием M2 опухоль-ассоциированных макрофагов индуцированным введением в терапию активатора макрофагов GcMAF.

Таким образом, при объединении в один терапевтический режим *in situ* вакцинации и технологии «Каранахан» удалось сочесть преимущества обеих технологий, достигнув достоверного повышения противоопухолевого терапевтического эффекта.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-365

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ НА ФОНЕ ВОСПАЛЕНИЯ, НА МОДЕЛИ DSS-
ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО КОЛИТА И КОЛИТ-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА ***

**IDENTIFICATION OF POTENTIAL CORE GENES INVOLVED IN MALIGNANT TRANSFORMATION
OF INFLAMED COLON TISSUE IN *IN VIVO* MURINE MODELS OF DSS-INDUCED ACUTE COLITIS
AND COLITIS ASSOCIATED CANCER**

И. А. Савин, А. В. Марков, М. А. Зенкова, А. В. Сенькова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

I. A. Savin, A. V. Markov, M. A. Zenkova, A. V. Sen'kova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ keshha_savin@mail.ru

Аннотация

В данной работе был проведен биоинформатический анализ наборов транскриптомных данных, полученных от мышей с острым колитом и колит-ассоциированным раком, с последующей валидацией на *in vivo* моделях колита, индуцированного декстраном сульфата натрия (DSS), и колит-ассоциированного рака. В результате был выявлен набор ключевых генов, участвующих в злокачественной трансформации тканей кишечника на фоне воспаления.

Abstract

In this study we report a bioinformatics analysis of transcriptomic datasets from mice with acute colitis and colitis-associated cancer and subsequent validation in *in vivo* models of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis and colitis-associated cancer. As a result, a set of key genes playing a core function in malignant transformation of colon tissue during inflammation was revealed.

Колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности и вторым по смертности злокачественным заболеванием [1]. Воспалительные процессы в кишечнике, вместе с генетической предрасположенностью и факторами окружающей среды, играют ключевую роль в инициации и прогрессии КРР [2]. Колит-ассоциированный рак (КАР) является одним из вариантов КРР и развивается на фоне таких воспалительных заболеваний кишечника как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит — высоко гетерогенных, неизлечимых и неуклонно прогрессирующих заболеваний пищеварительного тракта, связанных с иммунными нарушениями [3].

При воспалительных заболеваниях кишечника, хроническое и длительно текущее воспаление толстого кишечника, сопровождаемое окислительным стрессом, может изменить паттерны экспрессии ключевых генов, ассоциированных с канцерогенезом [4]. Более того, постоянная стимуляция пролиферации эпителия толстого кишечника, а также обширное повреждение клеток про-воспалительными стимулами приводят к неблагоприятным генетическим и иммунологическим изменениям, в результате которых пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника становятся предрасположенными к развитию КРР [5]. Несмотря на доказанное вовлечение процессов «воспаление-дисплазия-опухоль» в злокачественную трансформацию клеток при КРР [6], в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе данного процесса, еще остаются пробелы. В частности, не ясно, какие именно ключевые гены вовлечены в регуляцию острого колита и насколько сильно изменяется профиль их экспрессии при колит-ассоциированной злокачественной трансформации ткани толстого кишечника. Поскольку хирургическое лечение заболеваний кишечника, используемое при неэффективности консервативной терапии, приводит к значительному снижению качества жизни пациентов [7], поиск новых ключевых генов, вовлеченных в злокачественную трансформацию на фоне воспаления, которые могли бы быть использованы в качестве потенциальных молекулярных маркеров и мишеней при терапии воспалительных заболеваний кишечника является актуальной задачей.

В данной работе проведен анализ кДНК микрочиповых наборов данных, полученных от мышей с острым колитом (GSE42768, GSE35609, GSE71920) и КАР (GSE31106, GSE5605, SGSE64658, GSE42768), идентифицированы дифференциально экспрессированные гены (ДЭГ). Далее реконструкция и топологический анализ генно-ассоциативных сетей при комбинации с текст-майнинговым анализом ДЭГ выявили набор ключевых генов,

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-74-30011.

© И. А. Савин, А. В. Марков, М. А. Зенкова, А. В. Сенькова, 2023

вовлеченных в регуляцию колита (*C3*, *Tyrobp*, *Mmp3*, *Mmp9*, *Timp1*) и КАР (*Timp1*, *Adam8*, *Mmp7*, *Mmp13*), занимающие узловые позиции в регуломах данных патологий. Дальнейшая валидация данных биоинформатического анализа на мышинных моделях DSS-индуцированного колита и азоксиметан/DSS-индуцированного КАР полностью подтвердила ассоциацию выявленных узловых генов с воспалительными процессами и злокачественной трансформацией ткани кишечника, а также показала, что гены, кодирующие матриксные металлопротеиназы (острый колит: *Mmp3*, *Mmp9*; КАР: *Mmp7*, *Mmp13*), могут быть рассмотрены в качестве новых прогностических маркеров опухолевого роста при воспалительных заболеваниях кишечника.

Литература

1. Bardou, M.; Rouland, A.; Martel, M.; Loffroy, R.; Barkun, A.N.; Chapelle, N. Review: Obesity and colorectal cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2022, 56, 407–418.
2. Majumder, S.; Shivaji, U.N.; Kasturi, R.; Sigamani, A.; Ghosh, S.; Iacucci, M. Inflammatory bowel disease-related colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2022, 14, 547.
3. Grivennikov, S.I. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 2013, 35, 229–244.
4. Shah, S.C.; Itzkowitz, S.H. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. *Gastroenterology* 2022, 162, 715–730.e3.
5. Frigerio, S.; Lartey, D.A.; D'haens, G.R.; Grootjans, J. The Role of the Immune System in IBD-Associated Colorectal Cancer: From Pro to Anti-Tumorigenic Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12739.
6. Rogler, G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014, 345, 235–241.
7. Matson, J.; Ramamoorthy, S.; Lopez, N.E. The Role of Biomarkers in Surgery for Ulcerative Colitis: A Review. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 3362.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-366

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ 5-HT₇-TRKB ГЕТЕРОКОМПЛЕКСОВ *IN VITRO* *
IDENTIFICATION OF THE FUNCTIONAL ROLE OF 5-HT₇-TRKB HETEROCOMPLEXES *IN VITRO*

С. А. Самарина^{1,2}, А. С. Цыбко², В. С. Науменко², Т. В. Ильчибаева²¹Новосибирский государственный университет²Институт цитологии и генетики СО РАН, НовосибирскS. A. Samarina^{1,2}, A. S. Tsybko², V. S. Naumenko², T. V. Ilchibaeva²¹Novosibirsk State University²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ s.samarina@g.nsu.ru

Аннотация

Ранее нами было установлено, что 5-HT₇-рецептор и TrkB-рецептор, основной рецептор BDNF, формируют гетерокомплексы. Опираясь на известные данные, мы решили изучить функциональную роль комплекса 5-HT₇-TrkB *in vitro*. Данные показали, что активация TrkB агонистом блокируется в присутствии 5-HT₇-рецептора в клетке, но это не влияет на работу вторичного мессенджера; обработка агонистом 5-HT₇ в присутствии рецептора понижает уровень фосфорилирования TrkB.

Abstract

Previously we have identified heterocomplexes between serotonin 5-HT₇ receptor and tropomyosin-related receptor kinase B (TrkB), known as the main receptor for BDNF. Based on known data, we decided to study the 5-HT₇-TrkB complex functional role *in vitro*. According to data, TrkB activation by agonist is blocked when 5-HT₇ is present in the cell, although that does not affect second messenger's functioning; while 5-HT₇ agonist treatment in the presence of the receptor decreases TrkB phosphorylation level.

Седьмой тип серотониновых рецепторов (5-HT₇) регулирует широкий спектр физиологических функции организма как в норме, так и при развитии психических расстройств. Антагонисты 5-HT₇-рецептора используются в клинике для лечения депрессии и шизофрении. Тирозинкиназный рецептор B (TrkB) примечателен тем, что опосредует эффекты нейротрофического фактора мозга (BDNF), участвуя в процессах обучения, памяти, движения, выживания нейронов и развития нервной системы. Известно, что 5-HT₇-рецептор может объединяться в комплексы как с другими подтипами серотониновых рецепторов, так и с белками других классов (киназой CDK5 [1], гликопротеином CD44 [2]). Также показано повышение уровня фосфорилирования TrkB при активации 5-HT₇-рецептора *in vitro* [3]. Уже установлено, что 5-HT рецепторы могут формировать комплексы с TrkB. Так, при помощи методов ко-иммунопреципитации, FRET, PLA было подтверждено образование гетерокомплексов TrkB-5-HT_{2A} [4]. Ранее в нашей работе было показано формирование комплексов 5-HT₇-TrkB в ряде структур головного мозга мыши, а также повышение фосфорилирования TrkB в ответ на активацию 5-HT₇. Таким образом, целью нашей текущей работы стало определение функциональной роли комплекса 5-HT₇-TrkB *in vitro*.

Работа была проведена на линии клеток нейробластомы мыши N1E-115, трансфицированной плазмидами, содержащими гены *Htr7*, *Ntrk2* по отдельности и совместно. Детектировался уровень фосфорилирования TrkB-рецептора и его вторичного мессенджера MAPK в ответ на активацию рецепторов.

Было обнаружено, что уровень фосфорилирования TrkB-рецептора достоверно повышается ($p = 0,043$) при активации агонистом по сравнению с контролем при трансфекции плазмидой с геном *Ntrk2*, но не при котрансфекции с *Htr7*-содержащей плазмидой ($p = 0,46$). Однако в обоих случаях повысился уровень фосфорилирования MAPK ($p < 0,0001$). Эти данные могут говорить о блокировке активации TrkB агонистом в присутствии в клетке 5-HT₇-рецептора. Обработка агонистом 5-HT₇-рецепторов LP-211 не повлияла на фосфорилирование TrkB при отсутствии *Htr7*-содержащей плазмиды, но понизила уровень фосфорилирования при котрансфекции по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0131$). Уровень фосфорилирования MAPK при обработке LP-211 не менялся.

Таким образом, мы впервые показали влияние активации рецепторов, входящих в гетерокомплекс 5-HT₇-TrkB, на внутриклеточные каскады TrkB-рецептора *in vitro*. Полученные данные указывают скорее на ингибирующую роль 5-HT₇-рецептора, состоящего в комплексе с TrkB.

* Исследование было проведено при финансовой поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0023.

© С. А. Самарина, А. С. Цыбко, В. С. Науменко, Т. В. Ильчибаева, 2023

Литература

1. Labus J. et al. Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT7 receptor // *Progress in Neurobiology*. 2021. V. 197.
2. Bijata M. et al. Activation of the 5-HT7 receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior // *Cell Reports*. 2022. V. 11 (38).
3. Samarajeewa A. et al. 5-HT7 receptor activation promotes an increase in TrkB receptor expression and phosphorylation // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014. V. 8. P. 391
4. Ilchibaeva T. V. Et al. Serotonin receptor 5-HT2A regulates TrkB receptor function in heteroreceptor complexes // *Cells*. 2022. V. 11 (15). P. 2384

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-367

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ У *CAENORHABDITIS ELEGANS*
В ТЕЧЕНИЕ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА *****EXPRESSION OF COPPER METABOLISM GENES IN *CAENORHABDITIS ELEGANS*
DURING THE LIFE CYCLE**

П. Д. Самусева, А. А. Мехова

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

P. D. Samuseva, A. A. Mekhova

*Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University
ITMO University, Saint Petersburg*

✉ samusevap@yandex.ru

Аннотация

У нематод *C. elegans* с генетическим дефектом метаболизма меди изучена экспрессия генов транспортной системы меди (ТСМ) в течение онтогенеза. Показано, что у червей замена H828Q в белке CUA-1 (ортолог АТФазы Вильсона человека) при обработке Ag^{1+} вызывает значительную задержку в развитии и смерть на ранних этапах онтогенеза. Обсуждается значение последовательности включения активности генов ТСМ в процессе развития нематод.

Abstract

In the nematodes *C. elegans* with a genetic defect in copper metabolism, the expression of genes of the copper transport system (CTS) during ontogeny was studied. In worms, the H828Q substitution in the CUA-1 protein (ortholog of the human Wilson ATPase) was shown to cause a significant delay in development and death at the early stages of ontogeny upon treatment with Ag^{1+} . The significance of the sequence of turning on the activity of CTS genes in the development of nematodes is discussed.

Медь (Cu) является незаменимым микронутриентом. Она выступает в роли каталитического и структурного кофактора в купроэнзимах, участвующих в дыхании, транспорте железа, антиоксидантной защите, синтезе и созревании пептидных гормонов и нейромедиаторов, пигментации и свертывания крови. [1] Одновременно, свободные ионы Cu могут катализировать АФК, вызывающие окислительный стресс. Безопасный внутриклеточный уровень Cu поддерживается белками медь-транспортной системы (МТС). У человека это ось CTR1-АТОХ1-АТР7А/В, которая обеспечивает поглощение, распределение и выведение Cu. [2] Мутации в этих белках приводят к развитию нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Система высоко консервативна от дрожжей до человека [3]. Изучение молекулярно-генетических основ этих заболеваний и выбор эффективных лекарств требует генетически более простой модели, чем используемые в настоящее время животные модели млекопитающих. В представленной работе использовали нематоду *Caenorhabditis elegans*. У нематод идентифицированы обеспечивающие круговорот Cu ортологи генов МСМ человека. Так, ген *chca-1* соответствует гену *CTR1* (>30 % идентичности по белку), ген *suc-1* гену *АТОХ1* (>39 % идентичности по белку), ген *sua-1* генам *АТР7А/В* (>45 % идентичности *АТР7А/В* по белку). [3,4] Соответствующие белки, СНСА-1, СUC-1 и CUA-1, играют важную роль не только в поддержании баланса Cu, но и способствует процессу миграции специализированных клеток, участвуя в формировании гонад и вульвы. [5] У нематод методом RNAseq выявлена мРНК, программирующая синтез мембранной ферроксидазы семейства мультимедных голубых оксидаз. По данным молекулярной динамики пространственная структура её молекулы сходна с членами этого семейства у человека, которые принимают участие в распределении Cu в организме и в транспорте железа [6]. У червей H828Q ее уровень достоверно повышен.

Работа выполнена на нематодах *C. elegans* дикого (N2) и мутантного (H828Q) штаммов. Замена H828Q в белке CUA-1 *C. elegans* аналогична мутации H1069Q в АТР7В человека, которая приводит к развитию БВ. Особи штамма H828Q демонстрируют фенотип, схожий с фенотипом людей, страдающих БВ. Для искусственного нарушения баланса Cu использовали ионное серебро ($AgNO_3$). Ионы Cu(I) и серебра Ag(I) обладают изоэлек-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-24-00762.

тронными валентными оболочками с близкими ионными радиусами, что делает сходными их координационные свойства.

Для исследования скорости развития нематод в присутствии серебра животных синхронизировали на чашках с различными концентрациями AgNO_3 в среде (0, 0.5, 1 и 2 мкг/мл) и затем инкубировали 56 часов при 20 °С. Далее подсчитывали количество особей, достигших стадии young adult на каждой чашке, и рассчитывали их долю от общего числа червей на чашке. Для нематод штамма N2 статистически значимого снижения скорости развития в зависимости от концентрации серебра выявлено не было, все особи достигли стадии young adult. У нематод штамма H828Q скорость развития статистически значимо снижалась при концентрации серебра 1 мкг/мл и выше. Концентрация 1 мкг/мл является полуметальной для штамма H828Q. На чашках с концентрацией 2 мкг/мл ни одна особь мутантного штамма не достигла стадии young adult, а средняя летальность составила 92 %. Кроме того, у *C. elegans* штамма H828Q, которые на этапе синхронизации находились долгое время на чашках с концентрацией 2 мкг/мл AgNO_3 , отмечалось снижение фертильной функции.

Исследование экспрессии генов *cuo-1*, *chca-1* и *suc-1* в онтогенезе нематод проводили методом ПЦР в реальном времени. Для этого особей синхронизировали и культивировали в жидкой среде при 20 °С. Время инкубации варьировали в зависимости от стадии развития, которую необходимо было получить. Затем из полученного биоматериала выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом и синтезировали кДНК, которую далее использовали в качестве матрицы для ПЦР. У обоих штаммов нематод концентрация *cuo1*-мРНК в среднем в 10 раз выше на стадии яиц, по сравнению с остальными стадиями, кроме того, отмечается ее незначительное повышение на поздних стадиях развития нематод. Активность гена *chca-1* статистически значимо изменяется в течение жизненного цикла нематод. Наибольший уровень его экспрессии для обоих штаммов наблюдается на стадиях яиц, L2 и young adult, что свидетельствует об активном импорте в клетки нематод, а блокирование ее экскреции объясняет смерть особей штамма H828Q на стадии L2. Уровень экспрессии гена *suc-1* статистически значимо снижается от стадии яиц до стадии L3, а затем почти не изменяется.

Таким образом, обработка серебром нематод с генетическим нарушением меди приводит к нарушению развития нематод на ранних стадиях жизненного цикла.

Литература

1. Matson Dzebo M. et al. Extended functional repertoire for human copper chaperones. *Biomol Concepts*. 2016; 7: 29–39.
2. Festa R.A., Thiele D.J. Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol*. 2011;21: R877–R883.
3. Wakabayashi T. et al. Identification of the copper chaperone, CUC-1, in *Caenorhabditis elegans*: tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, CUA-1. *FEBS Lett*. 1998; 440: 141–146.
4. Zhang X. et al. The *Caenorhabditis elegans* homolog of human copper chaperone Atox1, CUC-1, aids in distal tip cell migration. *Biometals*. 2020; 33: 147–157.
5. Chun H. et al. The intestinal copper exporter CUA-1 Is required for systemic copper homeostasis in *Caenorhabditis elegans* // *J Biol Chem*. 2017; 292: 1–14.
6. Helman S.L. et al. The biology of mammalian multi-copper ferroxidases. *Biometals*. 2023; 36: 263–281.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-368

РОЛЬ TRFL-БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР *MARCHANTIA POLYMORPHA* ***THE ROLE OF TRFL PROTEINS IN THE REGULATION OF TELOMERE LENGTH *MARCHANTIA POLYMORPHA***А. В. Санникова¹, М. Р. Шарипова¹, Е. В. Шакиров^{1,2}, Л. Р. Валеева^{1,2}¹Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета²Отделение биологических наук, Научный колледж, Университет Маршалла, Западная Виржиния, Хантингтон, СШАA. V. Sannikova¹, M. R. Sharipova¹, E. V. Shakirov^{1,2}, L. R. Valeeva^{1,2}¹Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University²Department of Biological Sciences, College of Science, Marshall University, West Virginia, Huntington, USA

✉ anastasya.sannikova@bk.ru

Аннотация

Теломеры — нуклео-протеиновые структуры, защищающие физические концы хромосом эукариот от повреждений. Определяющую роль в поддержании стабильности теломер играют специфичные белки теломерного комплекса — белки TRF. В этой работе мы показали внутривидовую вариабельность длины теломер, а также установили участие теломерного белка TRFL в поддержании длины теломер у печеночника *M. polymorpha* как нового модельного объекта в изучении биологии теломер растений.

Abstract

Telomeres are nucleoprotein structures, involved in protection of the physical ends of eukaryotic chromosomes. A decisive role in maintaining telomere stability is played by specific proteins telomere complex are TRF proteins. Here, we have shown the intraspecific variability of telomere length and the involvement of TRFL protein in telomere length maintenance in a liverwort *M. polymorpha* as a new model plant for telomere biology studies.

Белки TRF (Telomere Repeat Factor) играют важную роль в стабилизации нуклео-протеинового комплекса у эукариот. Ранее было показано, что сверхэкспрессия hTRF1 в клетках человека играет роль негативного регулятора длины теломер, а повреждение TRF генов в клетках человека и дрожжей летальны [1]. Однако растения, в частности, *Arabidopsis thaliana*, сохраняют жизнеспособность даже при нокаутировании нескольких паралога TRFL. Работа с *A. thaliana* усложняется тем, что растение имеет множество гомологичных белков TRFL, из-за чего возникают трудности с анализом нокаутированных растений. Печеночник *M. polymorpha*, представляет собой уникальный модельный объект для изучения биологии клеток. В эволюции генома *M. polymorpha* не обнаружено недавних или древних дупликаций генома [2], что обуславливает меньшую генетическую избыточность. Биоинформационный анализ генома показал наличие только 3 паралога гена TRFL у *M. polymorpha* (TRB1, TBP1, TRFL6), в отличие от *A. thaliana* в геноме которого было обнаружено 12 паралога гена TRFL [3].

Целью работы было исследование длины и хромосомного распределение теломерной ДНК у печеночника *M. polymorpha* линии Takaragaike-1 и Takaragaike-2, а также получение индивидуальных растений — нокаутов по генам TRB1, TBP1 и TRFL6 методом редактирования генома, основанного на CRISPR/Cas9, и определение роли этих белков в регуляции длины теломер у *M. polymorpha*.

В качестве диких типов растений в работе были использованы аксеничные культуры печеночника *M. polymorpha* линии Takaragaike-1 (Так-1, мужское растение) и Takaragaike-2 (Так-2, женское растение). Мутантные растения получали методом редактирования генома CRISPR/Cas9 с применением агробактериальной трансформации. Селекцию проводили на среде GB5 с двумя антибиотиками хлорсульфуоном и гигромицином. Для анализа длины теломер использовали геномную ДНК, выделенную из таллома 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.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-14-00147.

© А. В. Санникова, М. Р. Шарипова, Е. В. Шакиров, Л. Р. Валеева, 2023

Нами было показано, что длина теломер в женском растении дикого типа Tak-2 в среднем составила ~ 3018 п.о., а в мужском растений Tak-1 ~ 2231 п.о., таким образом, длина теломер у мужского и женского растений отличается в 0.8 раз ($P \leq 0.05$), что, предположительно, может быть связано с наличием генетических факторов регуляции длины теломер, специфичных для половых хромосом. Также мы установили присутствие специфической теломерной последовательности, предположительно внутрихромосомной локализации, причем отличающиеся своим расположением и длиной внутри мужского и женского растения. Мы показали, что длина теломер *M. polymorpha* значительно отличается от длины теломер другого бриофита — *Physcomitrium patens*, средняя длина теломер которого составляет ~ 1280 п.о.

Методом CRISPR/Cas9 редактирования генома были получены 10 растений-нокаутов по гену TRFL6, 3 растения-нокаута по гену TBP1, 1 растение — нокаут по гену TRB1. Было показано, что длина теломер в мутантных растениях по гену TRFL6 имеет небольшое сокращение и составляет в среднем ~1811 п.о. по сравнению с диким типом (Tak-1), длина теломер которого составила ~ 2222 п.о. ($P \leq 0.05$). Длина теломер в мутантных растениях по гену TRB1 также имеет сокращение и составляет ~ 2730 п.о., по сравнению с диким типом (Tak-2), длина теломер которого составила ~ 3018 п.о. Также у растений-нокаутов по генам TRB1 и TRFL6 наблюдались дефекты развития тканей таллома.

Таким образом, мы показали, что длина теломер маршанции имеет внутривидовую вариабельность. Теломерные белки MrTRFL6 и MrTRB1 отвечают за позитивную регуляцию длины теломер. Мы предполагаем, что теломерные белки маршанции имеют расширенные функции и могут дополнительно отвечать за пути регуляции образования и развития таллома.

В дальнейшем будут получены мутантные растения с двойным и тройным нокаутом по генам TRFL6 × TRB1 × TBP1, что позволит более детально охарактеризовать функции TRFL-белков в регуляции длины теломер у растений *M. polymorpha*.

Литература

1. S. Hanaoka Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities // Protein Sci. 2005. P. 119–30.
2. J. L. Bowman Insights into Land Plant Evolution Garnered from the Marchantia polymorpha Genome // Cell. 2017. V. 171. P. 287–304.
3. E. V. Shakirov S.L. Salzberg, M. Alam, D.E. Shippen. Analysis of Carica papaya Telomeres and Telomere-Associated Proteins: Insights into the Evolution of Telomere Maintenance in Brassicales // Trop Plant Biol. 2008 V. 1. P. 202–215.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-369

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНВАЗИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В КЛЕТКИ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЗАВИСИТ ОТ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ
ИЗОФОРМ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ *INLA* И *INLB* ***

**THE EFFICIENCY OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* INVASION INTO CATTLE CELLS
DEPENDS ON PHYLOGENETICALLY DETERMINED ISOFORMS OF PATHOGENICITY
FACTORS *INLA* AND *INLB***

П. В. Сафарова^{1,2}, Я. М. Чаленко¹, В. А. Федорова², А. Е. Захарченко¹, С. А. Ермолаева¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва

P. V. Safarova^{1,2}, Y. M. Chalenko¹, V. A. Fedorova², A. E. Zakharchenko¹, S. A. Ermolaeva¹

¹Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

✉ polisomiya@gmail.com

Аннотация

Целью исследования является сравнение эффективности инвазии изогенных рекомбинантных штаммов *L. monocytogenes*, которые отличаются только аллельными вариантами гена *inlA* и *inlB*, в клеточные линии крупного рогатого скота.

Abstract

The aim of the research is to compare the invasion efficiency of isogenic recombinant strains of *L. monocytogenes*, which differ only in allelic variants of the *inlA* and *inlB* genes, in bovine cell lines.

Листерия — тяжелое заболевание, возбудителем которого является факультативная грамположительная бактерия *L. monocytogenes*. Среди сельскохозяйственных животных *L. monocytogenes* преимущественно поражает крупный и мелкий рогатый скот. Генерализованные формы листериоза связаны с пересечением эпителиальных барьеров. Белки семейства интерналинов (*InlA* и *InlB*) являются ключевыми факторами инвазии, которые опосредуют проникновение листерий в эпителиальные клетки [1]. MvLST-профилирование штаммов, относящихся к разным клональным комплексам в пределах одной филогенетической линии, показало, что высоковирулентные и низковирулентные штаммы отличаются аллельными вариантами *InlA* и *InlB*, при этом обладая идентичными островками патогенности. Нами была выдвинута гипотеза, что формирование высоковирулентных для сельскохозяйственных животных штаммов может быть связано с положительным отбором определенных аллельных вариантов факторов патогенности.

Ранее нами было установлено, что штаммы, имеющие общий генетический бэкграунд, но отличающиеся только аллельным вариантом *InlB* или *InlA*, демонстрируют различия в эффективности инвазии в эпителиальные клетки и отличаются по вирулентному потенциалу в разных моделях инфекции. Для подтверждения гипотезы были использованы клеточные линии почки эмбриона коровы (ПЭК), легкого эмбриона коровы (ЛЭК), почки взрослой коровы (MDBK) и почки теленка (ПТ-80), которые инфицировали диким штаммом EGDe, а также делеционными и рекомбинантными штаммами по *InlB* и *InlA*, полученными в нашей лаборатории. Фактор инвазии *InlB* оказался критически важным для инвазии, так как штамм, лишенный *InlB*, показал существенное снижение эффективности инвазии для всех клеточных линий. Анализ эффективности инвазии изогенных рекомбинантных штаммов, отличающихся только изоформой *InlB* показал, что для клеточных линий ЛЭК и ПЭК наибольшая инвазия наблюдалась у штамма CC1, в то время как для клеточных линий MDBK и ПТ-80 наибольшей инвазией обладал штамм CC2. Оба клональных комплекса принадлежат филогенетической линии I. Существенных различий в эффективности инвазии штаммов, принадлежащих филогенетической линии II, не наблюдалось. Исследование влияния фактора инвазии *InlA* показало, что инвазия *L. monocytogenes* в клеточную культуру MDBK не зависело от наличия или отсутствия *InlA*, в то время как для клеточных культур ПЭК, ЛЭК и ПТ-80 инвазия напрямую за-

* Работа поддержана грантом РФФ № 21-74-00105.

висела от InlA. Сравнение способности определенных изоформ InlA восстанавливать инвазивный фенотип штамма EGDe Δ InlA показало, что для клеточных линий ЛЭК, ПЭК и ПТ-80 достоверно наибольшая эффективность инвазии была у изогенного штамма, несущего аллельный вариант InlA, характерный для СС7.

В зависимости от клеточной линии наблюдалось различие взаимодействий листерий с эукариотическими клетками. *L. monocytogenes* продемонстрировала способность проникать во все использованные в работе клеточные линии, однако в клетках почки теленка и взрослой коровы не происходила репликация возбудителя и перестройка цитоскелета, следовательно, инфекционный процесс не развивался.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о взаимосвязи положительного отбора аллелей факторов патогенности InlB и InlA с формированием высоковирулентных штаммов, а также свидетельствуют о тканеспецифичности *L. monocytogenes* у соответствующего хозяина.

Литература

1. Radoshevich, L., Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 16, 32–46 (2018).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-370

**ПОДГОТОВКА РЕЦЕПТОРА, АССОЦИИРОВАННОГО С ПАТОГЕНЕЗОМ
РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА, ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ***

**SAMPLE PREPARATION OF A RECEPTOR ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS
PATHOGENESIS FOR STRUCTURAL STUDIES USING CRYOELECTRON MICROSCOPY**

Н. А. Сафронова, Т. С. Куркин, М. Б. Шевцов, А. А. Садова,
Ю. А. Загрядская, И. С. Охрименко, В. И. Борщевский, А. В. Мишин

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

N. A. Safronova, T. S. Kurkin, M. B. Shevtsov, A. A. Sadova,
Yu. A. Zagryadskaya, I. S. Okhrimenko, V. I. Borshchevskiy, A. V. Mishin

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ safronova.na@list.ru

Аннотация

В данной работе исследуется рецептор класса A GPCR (родопсиноподобный), филогенетически близкий к цистеинил-лейкотриеновым и к пуриновым рецепторам. Он экспрессируется в клетках-предшественниках олигодендроцитов и является регулятором формирования миелиновой оболочки нейронов. Для определения структуры этого рецептора методом криоэлектронной микроскопии была проделана большая работа по созданию стабильного и мономерного образца белка.

Abstract

In this work, we study the GPCR class A receptor (rhodopsin-like) which is phylogenetically close to cysteinyl leukotriene and purine receptors. It is expressed in oligodendrocyte progenitor cells and regulates formation of the myelin sheath of neurons. To determine the structure of this receptor by cryoelectron microscopy, we created a stable and monomeric protein sample.

Рецепторы, сопряженные с G белком (англ. G protein-coupled receptors, сокр. GPCR) — семейство рецепторов, включающее в себя около 800 семиспиральных трансмембранных белков. Различные GPCR связываются с самыми разными классами химических соединений — от малых молекул до пептидов и белков, и вовлечены во множество физиологических процессов — зрение, вкус, обоняние, эмбриональное развитие, регуляция поведения и настроения и др. В связи с этим GPCR являются важными мишенями для лекарственных препаратов. В настоящее время более трети выпускаемых лекарств нацелены на рецепторы класса GPCR [1].

В данной работе исследуется один из рецепторов класса A GPCR (родопсиноподобный), филогенетически занимающий промежуточное положение между цистеинил-лейкотриеновыми и пуриновыми рецепторами. Этот рецептор играет важную роль в развитии ЦНС, в частности, является регулятором формирования миелиновой оболочки нейронов. Рецептор экспрессируется в клетках-предшественниках олигодендроцитов на ранней стадии их развития, при этом экспрессия рецептора прекращается одновременно с началом формирования миелина. Искусственно созданная устойчивая экспрессия рассматриваемого рецептора у мышей приводит к нарушению формирования миелина и к симптомам, схожим с симптомами рассеянного склероза. При этом полная потеря мышцами гена этого рецептора не приводит к серьезным последствиям для здоровья [2–3]. Учитывая эти данные, рассматриваемый рецептор перспективен в качестве потенциальной мишени для разработки лекарственных препаратов для терапии рассеянного склероза и других подобных нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушением миелиновых оболочек нейронов.

Особенно актуальна задача поиска селективных и эффективных ингибиторов, обладающих минимальными побочными эффектами. Структура рецептора высокого разрешения поможет решить эту задачу, но для этого необходимо наладить гетерологичную экспрессию, наработать рецептор в достаточных количествах, а также добиться того, чтобы очищенный белок был достаточно стабильным и мономерным [1]. В своей работе мы решили эти задачи.

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-74-10036.

Был создан и охарактеризован ряд генно-инженерных конструкций рецептора для экспрессии в клетках насекомых Sf9. Конструкции были оптимизированы для повышения уровня экспрессии и термостабилизированы путем внесения в рецептор ряда точечных мутаций. Протокол выделения и очистки рецептора были подобраны таким образом, что выход белка и его стабильность были наилучшими. В итоге был получен мономер рассматриваемого рецептора в мицеллах из детергента. Кроме того, был получен ряд комплексов рецептора с различными фрагментами антител и G белками, также в мицеллах из детергента. С наиболее перспективными образцами проведены структурные исследования методом криоэлектронной микроскопии.

Литература

1. Dmitrieva, D.A., Kotova, T.V., Safronova, N.A. et al. Protein Design Strategies for the Structural-Functional Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry Moscow* 88 (Suppl 1), S192-S226 (2023).
2. Hennen S, Wang H, Peters L, et al. Decoding signaling and function of the orphan G protein-coupled receptor GPR17 with a small-molecule agonist. *Sci Signal.* 2013;6(298):ra93. Published 2013 Oct 22.
3. Chen Y, Wu H, Wang S, et al. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci.* 2009;12(11):1398-1406.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-371

**ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ
НА ОСНОВЕ ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ *B. BOVIS* И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *E. COLI****

**THERMAL STABILITY OF FUSION PROTEINS OF *B. BOVIS* DNA-EXOTRANSFERASE AND *E. COLI*
DNA-BINDING PROTEIN**

А. Б. Саченко, В. В. Щур, Я. В. Диченко, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

A. B. Sachanka, V. V. Shchur, Y. U. Dzichenka, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk

✉ antosuk@yandex.ru

Аннотация

Методами динамического светорассеяния (ДСР) и флуоресцентной спектроскопии установлено, что термостабильность ДНК-экзотрансферазы (*TdT*) возрастает при объединении в единую аминокислотную последовательность со стабилизирующим доменом ДНК-связывающего белка *E. coli* (*EcSSB*) в составе гибридного мультидоменного белка.

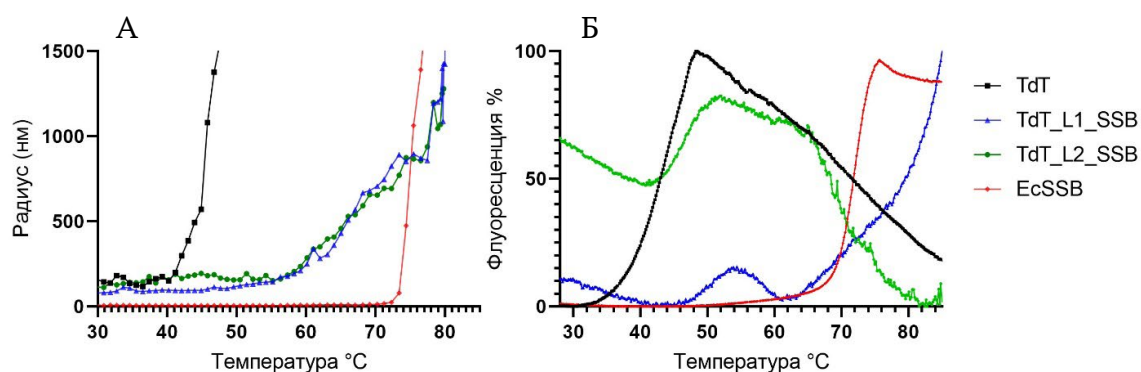
Abstract

As revealed by dynamic light scattering (DLS) and fluorescent detection fusion of *E. coli* DNA binding protein (*EcSSB*) domain to bovine DNA exotransferase (*TdT*) result in thermal stability increase of the whole protein.

Одной из важных задач белковой инженерии является повышение термодинамической стабильности ферментов. Большинство описываемых в литературе подходов не являются универсальными, требуют глубокого знания механизмов работы целевых ферментов, трудоемки и часто основаны на случайном мутагенезе и использовании библиотек синтетических генов [1, 2].

Добавление стабилизирующих белковых доменов также рассматривается как альтернативный способ получения мультидоменных термостабильных белков. В нашей работе в качестве такого домена рассматривается *EcSSB*, небольшой бактериальный белок, который обладает высокой стабильностью к повышенным температурам, изменениям кислотности среды, а также к хаотропным агентам [3].

Одним из интересных и уникальных объектов белковой инженерии, в последние годы, является фермент TdT, катализирующий неспецифическое добавление нуклеотидов к 3'-концевой последовательности одноцепочечной ДНК. Фермент выполняет важные функции при формировании иммунной системы млекопитающих и не обнаружен у термофильных микроорганизмов. Низкая термостабильность *TdT* ограничивает потенциал его использования как в системах для ДНК-детекции, так и для разработки и внедрения ферментативного *de novo* синтеза ДНК. Как правило фермент подвергается необратимой денатурации при температуре выше 40 °C [4].



Изменения гидродинамического радиуса белков (А) и интенсивности флуоресценции зонда (В) в растворах белков при повышении температуры

* Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № X21M-056 и Национальной академии наук Беларуси, соглашение о гранте № 2022-27-009.

© А. Б. Саченко, В. В. Щур, Я. В. Диченко, С. А. Усанов, А. В. Янцевич, 2023

Ранее полученные гибридные ферменты TdT_L1_SSB (линкер между доменами (Gly₃Ser)₂) и TdT_L2_SSB (линкер GGGGSGGGSGGG), а также нативные белки *TdT* и *EcSSB* [5], исследовались методом ДСР и флуоресцентной спектроскопии при градиентном изменении температуры.

Денатурация гибридных ферментов, детектируемая по изменению гидродинамического радиуса, начинается при температуре на 14 (TdT_L2_SSB) и 17 °С (TdT_L1_SSB) выше, чем для нативного *TdT*. Подобные результаты получены независимым способом при измерении флуоресценции, температура начала денатурации увеличилась для TdT_L1_SSB на 16 °С, а для TdT_L2_SSB на 17 °С.

Измеренная термостабильность для всех исследованных белков, также свидетельствует о существенном повышении термостабильности гибридных белков, по сравнению с исходным ферментом *TdT*. Обнаруженные различия в термостабильности исследованных гибридных белков, указывают на то, что для повышения термостабильности значение имеет не только структура добавленного домена, но и структура линкера.

Литература

1. Trevino S.R., Scholtz J.M., Pace C.N. Increasing protein conformational stability by optimizing beta-turn sequence // *Journal of Molecular Biology*. 2009. V. 373. P. 211–218.
2. Tadokoro T., Matsushita K., Abe Y., et al. Remarkable stabilization of a psychrotrophic RNase HI by a combination of thermostabilizing mutations identified by the suppressor mutation method // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 8040–8047.
3. Weiner J.H., Bertsch L.L., Kornberg A. The deoxyribonucleic acid unwinding protein of *Escherichia coli*. Properties and functions in replication // *Journal of Biological Chemistry*. 1975. V. 250(6). P. 1972–1980.
4. Sarac I., Hollenstein M. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in the Synthesis and Modification of Nucleic Acids // *ChemBioChem*. 2019. V. 20(7). P. 860–871.
5. Саченко А.Б., Диченко Я.В., Янцевич А.В. и др. Получение рекомбинантных мультидоменных гибридных белков на основе ДНК-экзотрансферазы *B. bovis* и ДНК-связывающего белка *E. coli* // Сборник статей Свиридовские чтения. 2022. Т. 18. С. 128–138.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-372

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА *TNF* НА ПОВЕДЕНИЕ, ЭКСПРЕССИЮ BDNF И СЕРТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ДЕКСАМЕТАЗОНА***EFFECT OF *TNF* GENE KNOCKOUT ON BEHAVIOR, BDNF EXPRESSION, AND BRAIN SEROTONIN SYSTEM DURING LONG-TERM ADMINISTRATION OF DEXAMETHASONE**А. К. Скотникова¹, С. Н. Адонина², В. С. Москалюк², Е. А. Куликова², Д. В. Базовкина²¹Новосибирский государственный университет²Институт цитологии и генетики СО РАН, НовосибирскA. K. Skotnikova¹, S. N. Adonina², V. S. Moskaliuk², E. A. Kulikova², D. V. Bazovkina²¹Novosibirsk State University²Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ a.skotnikova@g.nsu.ru

Аннотация

У мышей с нокаутом гена *Tnf* длительное введение дексаметазона привело к увеличению экспрессии гена *Bdnf* в гиппокампе и уровня белка proBDNF во фронтальной коре, а также к снижению двигательной активности, усилению депрессивно-подобного поведения и тревожности. У мышей дикого типа дексаметазон привел к ухудшению когнитивных способностей наряду с увеличением уровня proBDNF во фронтальной коре.

Abstract

In TNF KO mice, long-term administration of dexamethasone resulted in an increase in *Bdnf* gene expression in the hippocampus and proBDNF levels in the frontal cortex, as well as a decrease in motor activity, an increase in depression-like behavior and anxiety. In WT mice dexamethasone administration resulted in cognitive impairment along with an increase in proBDNF levels in the frontal cortex.

Провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) — один из ключевых посредников между иммунной и центральной нервной системой. TNF вовлечен в регуляцию поведения, нейротрофического обеспечения мозга, в частности, уровня BDNF (нейротрофического фактора мозга), и работу серотониновой системы мозга. В свою очередь, к изменениям уровня BDNF в мозге и нарушениям поведения может приводить хроническое введение синтетического глюкокортикоида дексаметазона.

Целью данной работы было исследование влияния полного нокаута гена *Tnf* на чувствительность мышей к длительному введению дексаметазона. Эксперименты проводили на половозрелых мышках с нокаутом гена *Tnf* (TNF KO) и мышках инбредной линии C57BL/6 (WT). Среди животных каждой линии 10 получали инъекции дексаметазона, другие 10 — инъекции физиологического раствора. Уровень экспрессии генов, кодирующих BDNF, его рецепторы и компоненты серотониновой системы в структурах мозга (префронтальная кора, гиппокамп, средний мозг) оценивали методом ОТ-ПЦР реального времени. Уровни белков BDNF и proBDNF оценивали методом Вестерн-блот анализа, а уровни 5-НТ и его метаболита 5-НИАА в структурах мозга исследовали методом ВЭЖХ.

Статистический анализ выявил снижение двигательной активности в тесте «Открытое поле» ($p < 0,05$), усиление депрессивно-подобного замирания в тесте «Подвешивание за хвост» ($p < 0,05$) и усиление тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» ($p < 0,05$) у мышей линии TNF KO в отличие от мышей WT при длительном введении дексаметазона. Напротив, ухудшение когнитивных способностей в тесте «Новый объект» наблюдали только у мышей WT ($p < 0,05$). В гиппокампе у мышей линии TNF KO было выявлено увеличение экспрессии гена *Bdnf* на уровне мРНК ($p < 0,05$) и увеличение уровня содержания белка proBDNF на уровне тенденции ($p = 0,061$), во фронтальной коре увеличение уровня содержания белка proBDNF сильнее было выражено у мышей TNF KO ($p = p < 0,05$ для WT и $p < 0,001$ для TNF KO). Дексаметазон привел к увеличению соотношения 5-НИАА/5-НТ в префронтальной коре на уровне тенденции ($p = 0,06$) и снижению экспрессии гена, кодирующего 5-НТ7 рецептор ($p < 0,05$), в среднем мозге животных линии TNF KO.

Полученные данные позволяют расширить представление о влиянии иммунной системы на нейротрофическое обеспечение и работу серотониновой системы мозга.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 21-15-00051.

© А. К. Скотникова, С. Н. Адонина, В. С. Москалюк, Е. А. Куликова, Д. В. Базовкина, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-373

ДЛИНА ТЕЛОМЕР У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО *
TELOMERE LENGTH IN PATIENTS WITH LUNG CANCER

О. А. Соболева¹, А. В. Торгунакова^{1,2}, В. И. Минина^{1,2}¹Федеральный исследовательский центр угля и углекислоты СО РАН, Кемерово²Кемеровский государственный университетO.A. Soboleva¹, A. V. Torgunakova^{1,2}, V.I. Minina^{1,2}¹Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry SB RAS, Kemerovo²Kemerovo State University

✉ soboleva.olga88@yandex.ru

Аннотация

Произведен анализ относительной длины теломер и полиморфных вариантов *rs2736100* гена *TERT* у 123 пациентов с диагнозом «рак легкого» и 120 здоровых индивидов. Теломеры онкобольных оказались статистически значимо более длинными ($p < 0,001$) по сравнению со здоровыми. В зависимости от носительства различных вариантов генотипов *TERT* достоверных отличий в длине теломер в обеих группах выявлено не было.

Abstract

An analysis was made of the relative length of telomeres and *rs2736100* polymorphic variants of the *TERT* gene in 123 patients diagnosed with lung cancer and 120 healthy individuals. The telomeres of cancer patients turned out to be statistically significantly longer ($p < 0,001$) compared to healthy ones. Depending on the carriage of various variants of the *TERT* genotypes, there were no significant differences in telomere length in both groups.

Рак легкого (РЛ) — ведущая причина летальных исходов среди всех злокачественных новообразований. На степень риска его формирования оказывает влияние курение, контакт с канцерогенами и общее состояние бронхолегочной системы [1]. Патологические процессы, запущенные в организме, могут влиять на длину теломер — регионов хромосом, отвечающих за поддержание стабильности генома, индивидуальная вариабельность которых может быть обусловлена носительством различных полиморфных вариантов гена теломеразной обратной транскриптазы (*TERT rs2736100*) [2].

Цель настоящего исследования — проанализировать длину теломер у больных РЛ с учетом носительства различных полиморфных вариантов гена *TERT rs2736100*.

Исследованием охвачено 243 жителя Кемеровской области. 123 человека включены в опытную группу — это пациенты, поступившие в ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», у которых впоследствии был подтвержден диагноз РЛ. 120 человек составили группу контроля — это здоровые жители Кузбасса, доноры Кемеровского областного центра переливания крови. Группы дифференцировали в зависимости от пола, возраста, статуса курения и наличия производственного риска. Пациентов с РЛ объединяли в подгруппы в зависимости от патоморфологического диагноза, стадий заболевания и наличия метастазов. Подробная характеристика обеих групп представлена в таблице.

Определение полиморфных вариантов гена *TERT rs2736100* выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых Taq-Man зондов. Соотношение частот генотипов в группе больных РЛ составило: 16,2 % — *TT*, 48,8 % — *TG* и 35,0 % — *GG*; в группе здоровых: 30,0 % — *TT*, 47,5 % — *TG* и 22,5 % — *GG* ($p = 0,027$). Наиболее значимая ассоциация с РЛ была выявлена в доминантной модели наследования (*T/G+G/G* против *T/T*): (ОШ = 2,21, 95 % ДИ = [1,19–4,09], $p = 0,01$).

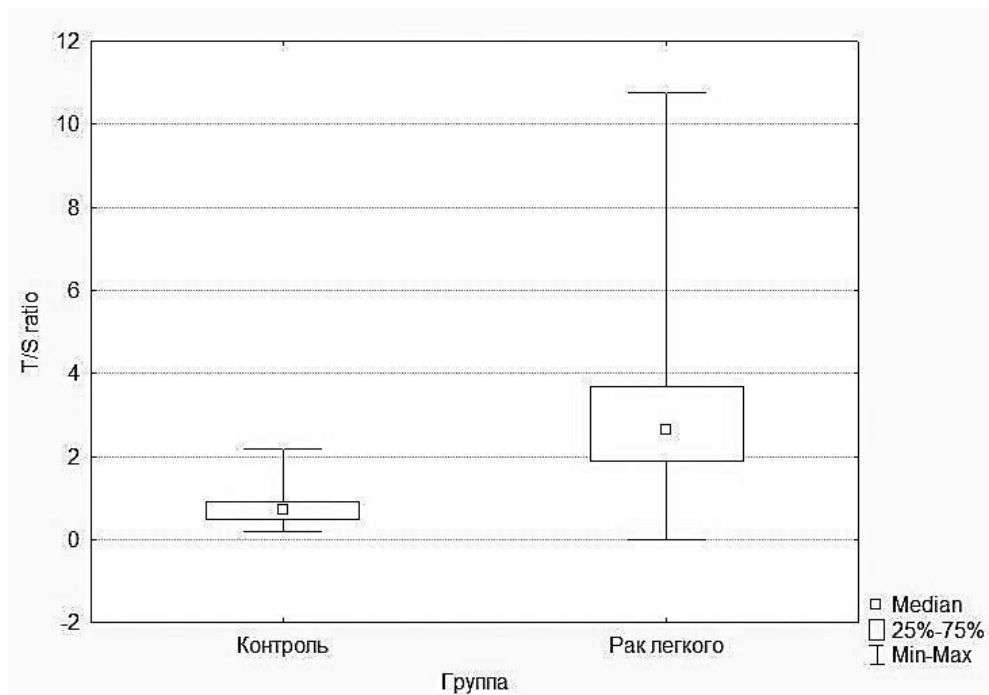
Относительную длину теломерных повторов (ОДТ) измеряли методом количественной ПЦР в режиме реального времени по методике Sawthorn [3]. В качестве референсного гена использовали однокопийный бета-глобин. По результатам анализа, ОДТ в группе больных РЛ статистически значимо превышала данный показатель в контрольной группе: Relative T/S ratio=4,092; $p < 0,0001$ (Relative T/S ratio — отношение ОДТ у больных РЛ к ОДТ в группе контроля).

* Исследование выполнено в рамках соглашения о создании молодежной лаборатории (лаборатория онкогеномики) ФИЦ УУХ СО РАН с Министерством науки и высшего образования Кузбасса №2 от 22 ноября 2022 г.

© О. А. Соболева, А. В. Торгунакова, В. И. Минина, 2023

Характеристика изученных групп

Характеристики		Больные РЛ (N)	Контрольная группа (N)
Обследовано всего		123	120
Мужчин / женщин		61/62	68/52
Возраст:	среднее ± std.откл.	60,3±5,39	56,4±4,71
	мин-макс	44-74	42-67
Курящие		63	45
Некурящие		52	75
Бросившие курить		8	0
Производственный риск (есть/нет)		57/66	5/118
Средний стаж работы на «вредном» производстве, лет		20,3	12,7
Патоморфологический диагноз РЛ (%)			
Плоскоклеточный РЛ		39,0	-
Аденокарцинома		35,8	-
Мелкоклеточный РЛ		10,6	-
Другие типы РЛ		14,6	-
Стадия заболевания (%; согласно TNM-классификации)			
I, II		42,3	-
III, IV		57,7	-
Наличие метастазов (%)			
Метастазы имеются		63,4	-
Метастазы отсутствуют		36,6	-



Сравнение относительной длины теломер между группами

При дифференцировке опытной группы в зависимости от пола, возраста, статуса курения и наличия производственных рисков, отличий в показателях ОДТ выявлено не было. В группе контроля теломеры оказались значимо короче у курящих ($p < 0,001$) и у представителей более старшего возраста ($p = 0,038$). У пациентов с РЛ, находящихся на более поздних стадиях болезни (III+IV) и имеющих метастазы, ОДТ статистически значимо превышала ОДТ у пациентов на I и II стадиях и без метастазов ($p < 0,001$). В зависимости от наиболее часто встречающихся патоморфологических диагнозов РЛ (плоскоклеточный, аденокарцинома, мелкоклеточный), отличий в показателях ОДТ выявлено не было. С учетом носительства полиморфного варианта *rs2736100* гена *TERT* в обеих группах отличий также выявлено не было ($p > 0,05$).

Для более полного понимания специфики выявленных взаимосвязей между длиной теломер и РЛ, необходимо увеличение объема выборки, которая могла бы позволить проводить дифференциацию групп в зависимости от множества потенциальных конфаундеров.

Литература

1. Ларин С. А., Мун С. А. Заболеваемость населения кемеровской области раком лёгкого и раком желудка с 1996 г. по 2015 г. // Медицина в Кузбассе. 2017. Т. 16 (2). С. 14–19.
2. McNally E. J., Luncsford P. J., Armanios M. Long telomeres and cancer risk: the price of cellular immortality // Clin Invest. 2019. V. 130. P. 3474–3481.
3. Cawthon R. M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucleic Acids Research. 2002. № 10. P. 47.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-374

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОГНОЗА
ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ
ПРИ РАКЕ ПРЯМОЙ КИШКИ

CIRCULATING DNA-MARKERS FOR PROGNOSIS AND PREDICTION
OF ANTITUMOR THERAPY IN COLORECTAL CANCER

А. И. Соловьева¹, А. А. Пономарева², Е. Ю. Рыкова^{3,4}, А. А. Тарасова²,
Д. Н. Костромицкий², А. Ю. Добродеев², С. А. Афанасьев², Н. В. Чердынцева^{2,5}

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск

²Научно-исследовательский институт онкологии —

филиал Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

⁴Новосибирский государственный технический университет

⁵Томский государственный университет

A. I. Solovyova¹, A. A. Ponomaryova², E. Yu. Rykova^{3,4}, A. S. Tarasova²,
D. N. Kostromitsky², A. Yu. Dobrodeev², S. A. Afanasiev², N. V. Cherdyntseva^{2,5}

¹Siberian State Medical University, Tomsk

²Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS

³Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

⁴Department of Engineering Problems of Ecology, Novosibirsk State Technical University

⁵Tomsk State University

✉ anastasia-ponomaryova@rambler.ru

Аннотация

Колоректальный рак (ПК) является одним из распространенных злокачественных заболеваний в мире. Анализ эпигенетических факторов при развитии ПК необходим для совершенствования диагностических и терапевтических стратегий лечения. «Жидкостная биопсия» является одним из адекватных подходов к выявлению изменений, ассоциированных с раком. Настоящее исследование посвящено изучению метилирования ретроэлементов LINE-1 и генов *SEPTIN9*, *IKZF1* в цирДНК крови больных ПК до и после лечения.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the frequent malignant diseases worldwide. The analysis of epigenetic factors contributed to the CRC development is needed for improvement of diagnostic and therapeutic strategies. “Liquid biopsy” seems to be an adequate approach to detect changes associated with cancer. This study devoted to investigation of methylation of LINE-1 retroelements and *SEPTIN9*, *IKZF1* genes in blood cirDNA from CRC patients before and after treatment.

Актуальность

Злокачественная трансформация клеток сопровождается общим снижением уровня метилирования, в частности, происходит гипометилирование LINE ретроэлементов, и увеличением уровня метилирования однокопийных генов. При онкопатологиях в составе внеклеточной циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы крови и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухоль-ассоциированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами (Rykova et al, 2018). Ранее показано, что уровень метилирования LINE-1 элементов и генов *SEPTIN9*, *IKZF1* изменяется в цирДНК плазмы крови больных раком кишечника по сравнению со здоровыми донорами (Young et al, 2021; Loomans-Kropp et al, 2022).

Цель

Анализ динамики уровня метилирования LINE-1 повторов и генов *SEPTIN9*, *IKZF1* в цирДНК крови больных раком прямой кишки (РПК) после проведения противоопухолевого лечения на отдаленных этапах наблюдения.

Материалы и методы

Получены образцы крови от больных РПК (n=15) до лечения, и после предоперационной химиотерапии (3 курса по схеме XELOX), на 10-15 сутки после операции, через каждые 3 мес. в процессе динамического наблюдения. Концентрацию метилированных и неметилированных фрагментов *LINE-1*, *SEPTIN9*, *IKZF1* определяли методом количественной метил-специфичной ПЦР.

Результаты

Выявлено значимое увеличение уровня метилирования *LINE-1* в скп-цирДНК у больных РПК после химиотерапии (1,5 раза) и после резекции опухоли (в 3 раза) ($p \leq 0,05$) (в 85 % случаев). У больных РПК уровень метилирования гена *IKZF1* в скп-цирДНК после резекции опухоли снижается в 2,5 раза по сравнению с показателями до лечения (в 50 % случаев), после химиотерапии в 1,5 раза — по сравнению с показателями до лечения (в 43 % случаев). Уровень метилирования гена *SEPT9* в скп-цирДНК снижается в 2,5 раза у 36 % пациентов после химиотерапии и после операции. Кроме того, у больных с признаками прогрессирования (n=2) выявлено увеличение уровня метилирования генов (*SEPTIN9*, *IKZF1*) и снижение уровня метилирования *LINE-1* в 2 раза и более в сравнении с уровнем на 10–15 сутки после операции. У больных РПК без признаков прогрессирования такая динамика не выявлена.

Выводы

Полученные результаты говорят о перспективности определения значимости исследованных aberrантно метилированных ДНК-маркеров для оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидивов на расширенной группе больных РПК.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-375

РОЛЬ БЕЛКА TRIM14 В ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ИНФЕКЦИЮ, ВЫЗВАННУЮ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ***THE ROLE OF THE TRIM14 PROTEIN IN THE IMMUNE RESPONSE TO A BACTERIAL INFECTION CAUSED BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN TRANSGENIC MICE**Е. А. Степаненко¹, Т. П. Герасимова¹, Н. Е. Бондарева², А. Б. Шеремет², Е. Д. Федина²,
А. Д. Тихомиров¹, И. В. Макарова¹, Н. А. Зигангирова², В. З. Тарантул¹, В. В. Ненашева¹¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, МоскваE. A. Stepanenko¹, T. P. Gerasimova¹, N. E. Bondareva², A. B. Sheremet², E. D. Fedina²,
A. D. Tikhomirov¹, I. V. Makarova¹, N. A. Zigangirova², V. Z. Tarantul¹, V. V. Nenasheva¹¹National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow²Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ katishsha@mail.ru

Аннотация

Исследование молекулярных механизмов взаимодействия системы врожденного иммунитета и бактериального патогена *Pseudomonas aeruginosa* может способствовать разработке новых подходов для борьбы с бактериальными инфекциями. В данной работе мы показали, что гиперэкспрессия гена *TRIM14* человека приводила к снижению выживаемости трансгенных мышей при инфекции *P. aeruginosa*. При этом увеличивалось количество фосфорилированного белка STAT3 (p-STAT3) в ядерной фракции в легких трансгенных животных после инфекции.

Abstract

The study of the molecular mechanisms of interaction between the innate immune system and the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* may contribute to the development of new approaches to combat bacterial infections. In this work, we showed that overexpression of human *TRIM14* led to a decrease in the survival rate of transgenic mice upon *P. aeruginosa* infection. At the same time, the amount of phospho-STAT3 (p-STAT3) protein in the nuclear fraction in the lungs of transgenic mice increased after infection.

Бактерии, наряду с вирусами, являются одной из главных причин инфекционных заболеваний и смертности во всем мире. Несмотря на разработку новых антибиотиков, бактериальные инфекции остаются серьезной проблемой здравоохранения, так как патогены постоянно адаптируются и вырабатывают новые механизмы резистентности к существующим противомикробным препаратам. Поэтому поиск новых классов антибактериальных агентов является важной и актуальной задачей. В связи с этим, мы обратили внимание на семейство белков TRIM (Tripartite motif), основной известной на сегодняшний день функцией которых является участие в работе врожденной иммунной системы, осуществляющей противовирусную защиту организма [1, 2]. В последнее время появились данные об участии некоторых TRIM белков и в защитном ответе системы врожденного иммунитета на бактериальную инфекцию. Выяснение механизмов вовлеченности белков, принадлежащих к семейству TRIM, в антибактериальный ответ может способствовать созданию новых подходов для борьбы с бактериальными заболеваниями.

Исследования антивирусного действия TRIM14 в нашей лаборатории показали, что этот белок участвует в подавлении размножения вирусов Синдбис [3] и гриппа [4]. Недавно было показано, что TRIM14 является основным регулятором интерфероновой ответа при инфекции *Mycobacterium tuberculosis* [5] и может ингибировать размножение *Listeria monocytogenes* [6]. Мы предположили, что TRIM14 может быть вовлечен в антибактериальный ответ врожденного иммунитета на инфекцию *Pseudomonas aeruginosa*, которая вызывает в определенных обстоятельствах тяжелые оппортунистические инфекции человека, затрагивающие дыхательные и мочевыводящие

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-25-00157.

пути, в том числе и нозокомиальные инфекции, такие как пневмония, менингоэнцефалит и сепсис. В качестве модели были использованы две независимые линии трансгенных мышей, гиперэкспрессирующих *TRIM14* человека, полученные в нашей лаборатории ранее [4].

Анализ жизнеспособности трансгенных по *TRIM14* мышей при интраназальном заражении *P. aeruginosa* показал значительное снижение выживаемости обеих линий трансгенных животных по сравнению с контрольной линией (гибридная линия C57BL/6хCBA, на основе которой были получены трансгенные линии [4]) (рис. 1).

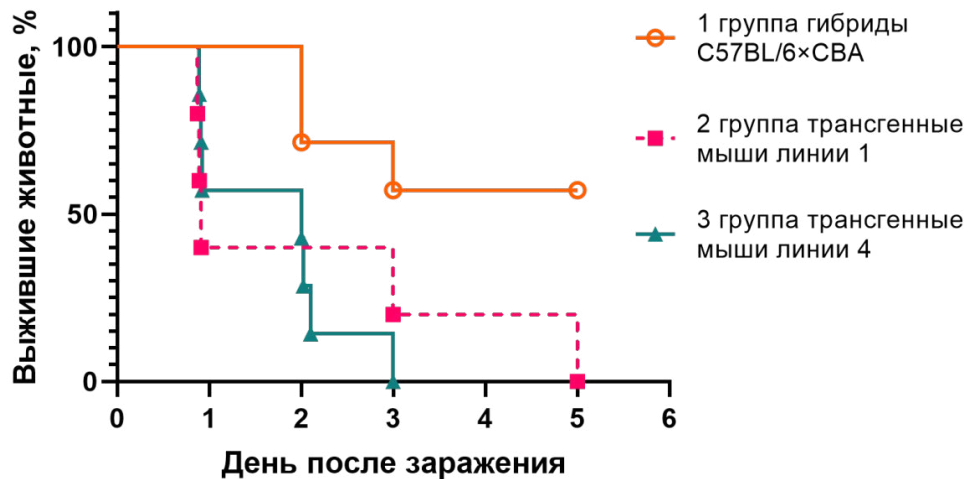


Рис. 1. *TRIM14* снижает выживаемость трансгенных мышей по сравнению с контрольной линией (гибридная линия C57BL/6хCBA) при заражении *P. aeruginosa*. N=10

Ранее было показано, что в клеточной линии макрофагов при инфекции *M. tuberculosis* [5] гиперэкспрессия *TRIM14* способствовала развитию инфекции, активируя STAT3, что приводило к подавлению интерферонового ответа. Мы провели анализ распределения фосфорилированного STAT3 в легких трансгенных и контрольных мышей при инфекции *P. aeruginosa* методом вестерн-блот гибридной и выяснили, что транслокация p-STAT3 в ядро у трансгенных животных так же была выше, чем у контрольных (рис. 2), что предполагает наличие схожего механизма иммунного ответа при гиперэкспрессии *TRIM14* на *M. tuberculosis* и на *P. aeruginosa*.

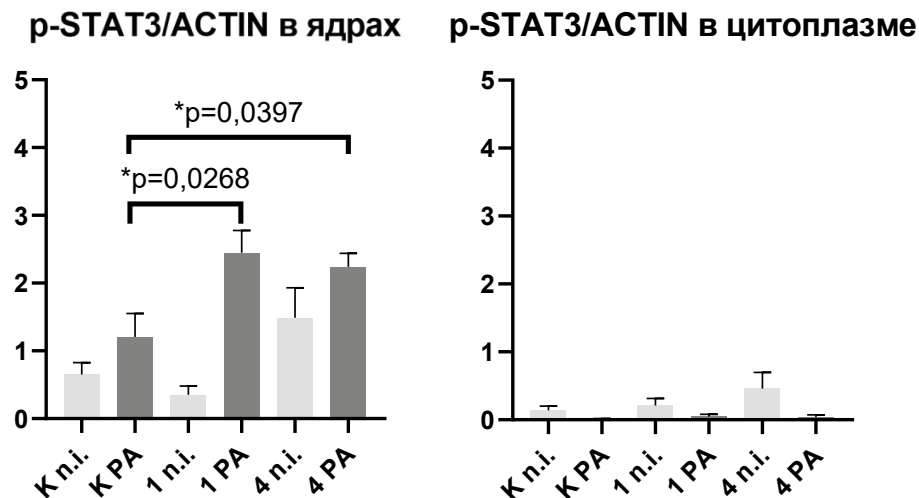


Рис. 2. Количество p-STAT3 в ядерной фракции, полученной из легких инфицированных *P. aeruginosa* трансгенных животных, достоверно выше, чем у контрольных. (K — гибридная линия, 1 и 4 — линии, трансгенные по *TRIM14*, n = 3)

Литература

1. Shen Z., Wei L., Yu Z. B., Yao Z. Y., Cheng J., Wang Y. T., Song X. T., Li M. The Roles of TRIMs in Antiviral Innate Immune Signaling // *Front Cell Infect Microbiol.* 2021. V. 15. P. 628275.
2. Wang L., Ning S. TRIMming Type I Interferon-Mediated Innate Immune Response in Antiviral and Antitumor Defense // *Viruses.* 2021. V. 13. P.279.
3. Nenasheva VV, Kovaleva GV, Uryvaev LV, Ionova KS, Dedova AV, Vorkunova GK, Chernyshenko SV, Khaidarova NV, Tarantul VZ. Enhanced expression of trim14 gene suppressed Sindbis virus reproduction and modulated the transcription of a large number of genes of innate immunity. *Immunol Res.* 2015, 62(3), 255-62.
4. Nenasheva VV, Nikitenko NA, Stepanenko EA, Makarova IV, Andreeva LE, Kovaleva GV, Lysenko AA, Tukhvatulin AI, Logunov DY, Tarantul VZ. Human TRIM14 protects transgenic mice from influenza A viral infection without activation of other innate immunity pathways. *Genes Immun.* 2021, 22(1), 56-63.
5. Hoffpauir CT, Bell SL, West KO, Jing T, Wagner AR, Torres-Odio S, Cox JS, West AP, Li P, Patrick KL, Watson RO. TRIM14 Is a Key Regulator of the Type I IFN Response during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol.*, 2020, 205(1), 153-167.
6. Perelman SS, Abrams ME, Eitson JL, Chen D, Jimenez A, Mettlen M, Schoggins JW, Alto NM. Cell-Based Screen Identifies Human Interferon-Stimulated Regulators of *Listeria monocytogenes* Infection. *PLoS Pathog.* 2016, 12(12), e1006102.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-376

**МЕТОД РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В МАЛОИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ГЛИОМ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ**

**METHOD OF RAMAN SPECTROSCOPY IN MINIMALLY INVASIVE DIAGNOSTICS OF GLIOMAS
OF VARIOUS GRADES OF MALIGNANCY USING MACHINE LEARNING TECHNOLOGIES**

Е. В. Ступак¹, В. В. Ступак¹, В. М. Глотов¹, А. И. Князькова²,
А. А. Самарина², Д. А. Вражнов², О. П. Черкасова^{3,4}

¹Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна

²Лаборатория лазерной молекулярной визуализации и машинного обучения
Томского государственного университета

³Факультет автоматики и вычислительной техники,
Новосибирский государственный технический университет

⁴Институт лазерной физики СО РАН, Новосибирск

E. V. Stupak¹, V. V. Stupak¹, V. M. Glotov¹, A. I. Knyazkova²,
A. A. Samarina², D. A. Vrazhnov², O. P. Cherkasova^{3,4}

¹Novosibirsk Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Y. L. Tsivyan

²Laboratory of Laser Molecular Imaging and Machine Learning, Tomsk State University

³Faculty of Automation and Computer Engineering, Novosibirsk State Technical University

⁴Institute of Laser Physics SB RAS, Novosibirsk

✉ stupakphoto@mail.ru

Аннотация

Глиомы являются одними из самых часто регистрируемых злокачественных опухолей ЦНС. В данный момент не существует методов диагностики опухолей головного мозга, таких как определение маркеров плазмы крови. В нашем исследовании рамановская спектроскопия плазмы крови в сочетании с технологиями машинного обучения позволяет дифференцировать пациентов с глиомами головного мозга от пациентов без онкологической патологии, данный метод может быть использован для малоинвазивной диагностики и определения степени злокачественности глиом головного мозга.

Abstract

Gliomas are one of the most frequently reported malignant tumors of the CNS. Currently, there are no methods for diagnosing brain tumors, such as determining blood plasma markers. In our study, Raman spectroscopy of blood plasma in combination with machine learning technologies makes it possible to differentiate patients with brain gliomas from patients without oncological pathology, this method can be used for minimally invasive diagnosis and determination of the degree of malignancy of brain gliomas.

Введение

Глиомы являются одними из самых часто регистрируемых злокачественных новообразований центральной нервной системы. Частота опухолей головного мозга у взрослого населения составляет от 13 до 18 на 100 000 населения в год. Медиана выживаемости составляет от 8 до 20 месяцев. В настоящий момент в клинической практике не существует малоинвазивных методов диагностики головного мозга, таких как определение маркеров плазмы крови.

Рамановская спектроскопия обладает высокой чувствительностью к связям C–C, C=C и C≡C, позволяет определять конформацию и изменения вторичной структуры белков, состояние полярных и неполярных групп на поверхности ферментов. Метод рамановской спектроскопии позволяет исследовать химический состав образцов, находящихся в любом агрегатном состоянии и независимо от их количества. Выявлены статистические различия в анализе спектров глиом разных степеней злокачественности на мышцах в эксперименте.

Таким образом, выявление маркеров глиом на разных стадиях развития малоинвазивными методами является актуальным вопросом современной медицины.

Цель исследования

Определить рамановские спектры плазмы крови у пациентов с глиомами разной степени злокачественности с помощью рамановской спектроскопии и технологий машинного обучения.

Материалы и методы

Рамановская спектроскопия с использованием рамановского микроскопа DXR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) с увеличением 10×, длиной волны возбуждения 532 нм и диапазоном 80–4000 см⁻¹; забор венозной крови с последующим центрифугированием; методы машинного обучения PCA, SVM, XGBoost, RF.

Результаты

В исследование было включено 34 пациента. В группу исследования включено 13 человек (8 мужчин и 5 женщин), в возрасте от 30 до 75 лет включительно (средний возраст 50,1 лет), оперированные в нейрохирургическом отделении Новосибирского НИИТО с диагнозом «глиома головного мозга разной степени злокачественности». В группу сравнения были включены 21 пациент мужского и женского пола в возрасте от 23 лет до 78 лет включительно (средний возраст 49,9 лет) без онкологической патологии. Было произведен забор и центрифугирование крови до операции и на 7 сутки после операции. Образцы были подвергнуты рамановской спектроскопии. Из-за большого объема данных с целью отсеивания на первом этапе анализа рамановских спектров проводилось предварительное уменьшение размерности данных при помощи метода анализа главных компонент (PCA). Затем разделимость данных была проанализирована с помощью прогностической модели на основе метода опорных векторов с линейным ядром (SVM), метода градиентного бустинга (XGBoost) и случайного леса (RF). Качество каждого классификатора оценивалось с использованием анализа ROC-кривой и площади под кривой (AUC). Выбранные нами прогностические модели работают одинаково и показывают дискриминацию AUC>0.9, т. е. позволяют по рамановскому спектру плазмы крови отделить пациентов с глиомой от пациентов без онкопатологии, а также разделить пациентов до операции и после удаления опухоли.

Выводы

Рамановские спектры плазмы крови в сочетании с технологиями машинного обучения могут использоваться для малоинвазивной диагностики и определения степени злокачественности глиом головного мозга.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-377

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА MYC НА МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК ЛИНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***EFFECT OF ACTIVATION OF MYC GENE EXPRESSION ON A METASTASIS POTENTIAL OF A BREAST CANCER CELL LINE**Е. В. Сухинина^{1,2}, П. К. Козлова^{1,3}, К. В. Невская¹, Н. В. Литвяков⁴, А. Г. Першина^{1,2}¹Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск²Томский политехнический университет³Томский государственный университет⁴Научно-исследовательский институт онкологии Томского НИМЦE. V. Sukhinina^{1,2}, P. K. Kozlova^{1,3}, K. V. Nevskaya¹, N. V. Litvyakov⁴, A. G. Pershina^{1,2}¹Siberian State Medical University, Tomsk²Tomsk Polytechnic University³Tomsk State University⁴Cancer Research Institute, Tomsk NRMC

✉ suhininaev@mail.ru

Аннотация

Гиперэкспрессия гена *MYC* играет важную роль в прогрессии опухолей и стволовой пластичности раковых клеток. Целью данного исследования было создать клеточную линию рака молочной железы BT-549 с повышенной экспрессии гена *MYC*, используя метод активации SAM на базе системы CRISPR/Cas9. Полученная клеточная линия демонстрирует увеличение количества CD44⁺CD24⁻ клеток, а также увеличение количества и диаметра образуемых маммосфер. Проведенные исследования открывают новые возможности для изучения механизмов метастазирования опухолей.

Abstract

The overexpression of the *MYC* gene plays a crucial role in the advancement of tumors and the plasticity of malignant cells. This study aimed to create breast cancer cell line BT-549 with activated *MYC* gene, using the CRISPR/Cas9-based SAM activation technique. The modified cell line demonstrates an increase in the fraction of CD44⁺CD24⁻ cells, as well as increase in the number and diameter of mammospheres formed. These studies open new opportunities for investigation of the mechanisms related to metastasis.

Гиперэкспрессия гена стволовой пластичности *MYC* наблюдается при многих видах рака и определяет фенотип раковых клеток с ускоренным клеточным ростом, метаболическим репрограммированием и высоким метастазированием [1]. Приобретение свойств раковых стволовых клеток является одним из основных процессов опухолевой пластичности, позволяющим клеткам обратимо переключаться между пролиферативным метастатическим и дормантным лекарственно-резистентным состояниями [2]. Создание изогенных клеточных линий с разным уровнем экспрессии *MYC* позволит детально исследовать механизмы опухолевой пластичности и их роль в метастазировании рака.

Целью исследования было создать клеточную линию рака молочной железы человека BT-549 с повышенной экспрессией гена *MYC*.

Для активации экспрессии был использован метод CRISPR/Cas9 SAM-активации [3]. Были сконструированы 3 рекомбинантные плазмиды, кодирующие направляющую РНК к участку промотора гена *MYC* человека. Далее, были наработаны лентивирусные частицы, кодирующие компоненты SAM-комплекса (dCas-VP64, MS2-r65-HSF1) и разные направляющие РНК. Интеграция трансгенов, кодирующих компоненты SAM комплекса, в геном клетки-хозяина в результате трансдукции лентивирусными векторами обеспечивала стабильную активацию экспрессии целевого гена. После отбора клонов, устойчивых к антибиотику, и выделению моноклональной линии, активация экспрессии гена *MYC* была подтверждена методами ПЦР в реальном времени, Вестерн блот анализа и иммунофлуоресцентного окрашивания с анти-с-Мус антителами. Профилирование экспрессии генов полученных линий было выполнено при помощи полнотранскриптомных микроматриц Clarius S.

* Работа выполнена при поддержке гранта Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. по теме: «Генетическое и эпигенетическое редактирование клеток опухоли и микроокружения с целью блокировки метастазирования» (соглашение № 075-15-2021-1073 от 29 сентября 2021 г.).

В результате проведенного исследования были получены изогенные клеточные линии карциномы молочной железы человека BT-549 (имеющей базально нормальный уровень экспрессии *MYC*) с активацией гена *MYC*. В модифицированных клеточных линиях наблюдалось изменение доли стволовых клеток. Для BT-549 с активацией *MYC* было показано увеличение доли CD44⁺CD24⁻ клеток в популяции, а также они демонстрировали увеличение количества и диаметра образуемых маммосфер.

Таким образом, увеличение экспрессии гена *MYC* приводит к усилению метастатического потенциала раковых клеток. Полученные изогенные клеточные линии интересны в контексте исследования процессов опухолевой пластичности и метастазирования при разработке новых терапевтических подходов.

Литература

1. Dang C. V. *MYC* on the path to cancer // *Cell*. 2012. V. 149. P. 22–35.
2. Shi Z. D., Pang K., Wu Z. X. et al. Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies // *Sig Transduct Target Ther*. 2023. V. 8. P. 113.
3. Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T. et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs // *Sci Rep*. 2015. V. 5. P. 16277.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-378

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ SNP, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАСПОЛОЖЕННЫХ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ***FUNCTIONAL ANALYSIS OF SNPs ASSOCIATED WITH SEVERE VIRAL RESPIRATORY DISEASES AND LOCATED IN THE REGULATORY REGIONS OF ANTIVIRAL IMMUNE RESPONSE GENES**А. Н. Уварова^{1,2}, Е. А. Ткаченко^{1,2}, К. В. Корнеев^{1,5}, Д. В. Купраш^{1,2}¹*Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*²*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*³*Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения РФ, Москва*A. N. Uvarova^{1,2}, E. A. Tkachenko^{1,2}, K. V. Korneev^{1,5}, D. V. Kuprash^{1,2}¹*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*²*Lomonosov Moscow State University*³*National Research Center for Hematology, Moscow*

✉ uvarowww@gmail.com

Аннотация

Мы исследовали регуляторные области генов CD55, LGALS1 и IFNAR2 в клеточных моделях макрофагов и В-лимфоцитов человека, а также проанализировали ряд SNP в регуляторных областях выбранных генов, ассоциированных с тяжелым течением COVID-19 или гриппа. В ходе работы мы охарактеризовали энхансер гена IFNAR2 и выполнили функциональную аннотацию нескольких SNP в промоторах генов CD55 и LGALS1.

Abstract

We investigated the regulatory regions of the CD55, LGALS1, and IFNAR2 genes in cell models of human macrophages and B-cells and analyzed several SNPs located in the regulatory regions of these genes and associated with severe COVID-19 or flu. In the course of this work, we characterized the IFNAR2 gene enhancer and performed functional annotation of several SNPs in the CD55 and LGALS1 promoters.

Вирусные инфекции составляют значительную долю респираторных заболеваний нижних дыхательных путей, которые входят в пятерку лидирующих причин смертности даже в развитых странах [1]. На данный момент известен ряд однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), ассоциированных с тяжестью течения вирусных респираторных заболеваний [2,3], однако не во всех случаях известны молекулярные механизмы, ответственные за эту ассоциацию. По поводу SNP некодирующих областей генома известно, что их функциональная роль часто обуславливается аллель-зависимым изменением силы связывания с полиморфным участком определенных транскрипционных факторов [4-6]. Продукты выбранных для исследования генов — ингибитор системы комплемента CD55, белок межклеточного взаимодействия галектин-1 и интерфероновый рецептор — играют важную роль во врожденном противовирусном ответе [7-9]. Мы клонировали регуляторные элементы этих генов с разными вариантами выбранных SNP (rs2564978, rs4820294 и rs12482193) в вектор с репортерным геном. Согласно данным люциферазных тестов, область потенциального энхансера в первом интроне гена *IFNAR2* на порядок увеличивала активность промотора гена в активированных клетках линии Reh (В-лимфоциты). Также, риск-аллели полиморфизмов rs2564978 и rs4820294, располагающихся в промоторах генов *CD55* и *LGALS1* соответственно, снижали активность соответствующих промоторов в активированных клетках линии U937 (модель макрофагов). С использованием биоинформатических ресурсов мы определили транскрипционные факторы SPI1, STAT1 и ELF1, вероятно аллель-специфически связывающиеся с исследуемыми регуляторными областями. Затем, с помощью подавления экспрессии выбранных транскрипционных факторов с помощью малых интерферирующих РНК и использованием специфической активации, мы показали роль этих транскрипционных факторов в активности изучаемых регуляторных элементов.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 22-24-00987.

© А. Н. Уварова, Е. А. Ткаченко, К. В. Корнеев, Д. В. Купраш, 2023

Литература

1. Fullman N, Mosser J, Thompson RL et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // *The Lancet Infectious Diseases*. 2017. 17(11). P. 1133-1161.
2. Severe Covid-19 GWAS Group. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure // *New England Journal of Medicine*. 2020. 383(16). P. 1522-1534.
3. Clohisey S, Baillie JK. Host susceptibility to severe influenza A virus infection // *Critical Care*. 2019. 23(1). P. 1-10.
4. Mitkin NA, Muratova AM, Korneev KV et al. Protective C allele of the single-nucleotide polymorphism rs1335532 is associated with strong binding of Ascl2 transcription factor and elevated CD58 expression in B-cells // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018. 1864(10). P. 3211-3220.
5. Gorbacheva AM, Korneev KV, Kuprash DV, Mitkin NA. The risk G allele of the single-nucleotide polymorphism rs928413 creates a CREB1-binding site that activates IL33 promoter in lung epithelial cells // *Int J Mol Sci*. 2018. 19(10). P. 2911.
6. Korneev KV, Sviriaeva EN, Mitkin NA et al. Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4 expression // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020. 1866(3). P. 165626.
7. Dho SH, Lim JC, Kim LK. Beyond the role of CD55 as a complement component // *Immune network*. 2018. 18(1).
8. Lin CY, Yang ZS, Wang WH et al. The Antiviral Role of Galectins toward Influenza A Virus Infection—An Alternative Strategy for Influenza Therapy // *Pharmaceuticals*. 2021. 14(5). P. 490.
9. Duncan CJ, Mohamad SM, Young DF et al. Human IFNAR2 deficiency: Lessons for antiviral immunity // *Science translational medicine*. 2015. 7(307). P. 307ra154.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-379

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ СЛОЖНОЭКСПРЕССИРУЕМЫХ БЕЛКОВ АНТИРЕСТРИКЦИИ ARDA И ARDB В ТЕРМОИНДУЦИБЕЛЬНОМ ВЕКТОРЕ PIR-DPAL***HIGH-YIELD PRODUCTION OF “DIFFICULT-TO-EXPRESS” PROTEINS ARDA AND ARDB WITH THE THERMO-INDUCIBLE VECTOR PIR-DPAL**

А. А. Уткина, А. А. Кудрявцева, И. В. Манухов

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

A. A. Utkina, A. A. Kudryavtseva, I. V. Manuhkov

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ utkina.anna.a@phystech.edu

Аннотация

Белки антирестрикции ArdA и ArdB ингибируют систему рестрикции-модификации (RM) I типа [1]. Такие белки обычно трудно получить в *Escherichia coli* в большом количестве ввиду их токсичности для клеток. Данная работа посвящена клонированию генов *ardA* и *ardB* в термоиндуцибельный вектор pIR-DPAL, что позволило увеличить эффективность их экспрессии и очистки.

Abstract

The antirestriction proteins ArdA and ArdB inhibit type I restriction-modification (RM) systems. Such proteins are usually difficult to obtain in *Escherichia coli* cells in large quantities since they are toxic to the host cell. This work is devoted to the cloning of the *ardA* and *ardB* antirestrictase genes into the thermo-inducible vector pIR-DPAL vector, which made it possible to increase the efficiency of its expression and purification.

Белки антирестрикции как правило закодированы в трансмиссивных плаزمидях или геномах фагов, поскольку они способствуют сохранению попавшей в клетку чужеродной ДНК. Трансмиссивные плазмиды играют важную роль в горизонтальном переносе генов — явлении, оказывающем влияние на распространение антибиотикорезистентности, особенно между генетически далекими штаммами. Изучение антирестрикторных белков, в том числе разрешение их структур, позволит контролировать передачу антибиотикорезистентных свойств, что в свою очередь позволит повысить эффективность антимикробной терапии [2].

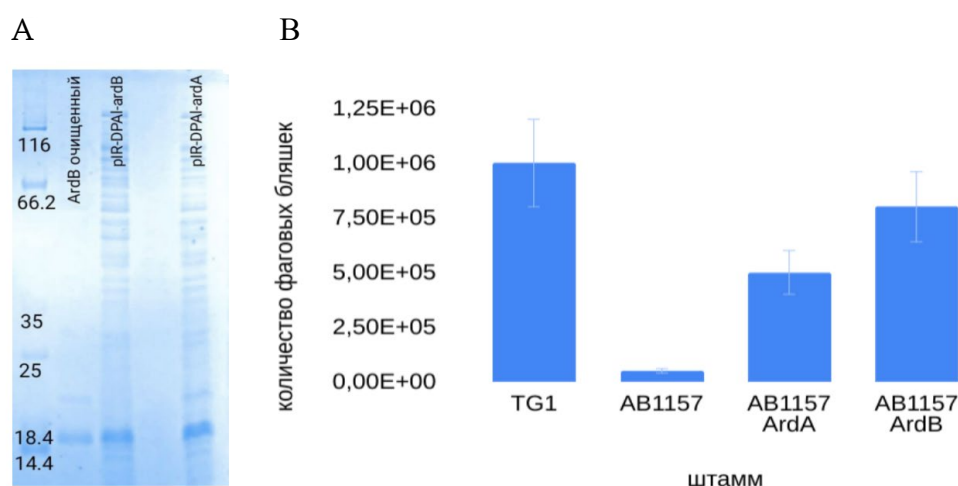
Для изучения структуры белка необходима его наработка в препаративных количествах и нативном состоянии. В предыдущих работах, посвящённых экспрессии и очистке ArdB, ген *ardB* экспрессировали в штаммах, содержащих собственную RM систему, с субъединицами которой связывается ArdB при выделении [3]. В связанном состоянии белок выпадает в осадок и находится в тельцах включения, что усложняет его выделение и очистку.

Для выяснения структуры белка ArdB необходима экспрессия его в штамме *E. coli*, не содержащем собственной системы рестрикции-модификации. Это было достигнуто путём клонирования гена *ardB* из конъюгативной плазмиды R64 в вектор pIR-DPAL с термоиндуцибельным промотером из *Aliivibrio logei*. Наряду с ArdB была клонирована другая антирестриктаза из конъюгативной плазмиды R64 — ArdA, структура которой тоже пока неизвестна.

При помощи клонирования по Гибсону в вектор pIR-DPAL были получены плазмиды pIR-DPAL-ardB и pIR-DPAL-ardA. Экспрессия белков осуществлялась в штамме *E. coli* TG1, который не содержит систему рестрикции-модификации. Наработка антирестриктаз проводилась при 22 °C в течение 19 часов. Процентное содержание целевого белка по отношению к общему белку после экспрессии в новой плазмиде составило более 30 % (см. рисунок, А) Белок антирестрикции ArdA, более токсичный чем ArdB, также показал высокую эффективность экспрессии.

Для оценки функционирования ArdB и ArdA, экспрессируемых в новой плазмиде, был проведён фаговый посев [4]. Согласно полученным результатам, активность белка после клонирования в новый вектор сохранилась (см. рисунок, В).

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ в рамках проекта № 22-74-00027.
© А. А. Уткина, А. А. Кудрявцева, И. В. Манухов, 2023



А — SDS-PAGE лизатов клеток *E. coli* pIR-DPAI-ArdB и *E. coli* pIR-DPAI-ArdA после индукции биосинтеза белка;
В — результаты фагового посева фага λ .0 на газон из клеток *E. coli*, содержащих гены *ardA* и *ardB*, экспрессированных в векторе *pIR-DPAI*. Погрешность представляет собой стандартное отклонение по результатам трёх независимых измерений

Экспрессированный в новой плазмиде белок был очищен при помощи аффинной хроматографии на колонке Ni-NTA и при помощи гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superose 6. В ходе изучения при помощи ДРС был выяснен гидродинамический радиус белка — 2,9 нм, что соответствует димерному состоянию.

Литература

1. Delver, E. P., Kotova, V. U., Zavilgelsky, G. B., & Belogurov, A. A.. Nucleotide sequence of the gene (*ard*) encoding the antirestriction protein of plasmid collb-P9 // *Journal of Bacteriology*. 1991. V. 173 P. 5887–5892.
2. Chen, H., Tao, S., Li, N., Wang, F., Wang, L., Tang, Y., & Liang, W. Functional comparison of anti-restriction and anti-methylation activities of ArdA, KlcA, and KlcAHS from *Klebsiella pneumoniae* // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022. V. 12. P. 1–14.
3. Kudryavtseva, A. A., Okhrimenko, I. S., Didina, V. S., Zavilgelsky, G. B., & Manukhov, I. V. Antirestriction Protein ArdB (R64) Interacts with DNA // *Biochemistry*. 2020. V. 85, P. 318–325.
4. Kudryavtseva, A. A., Okhrimenko, I. S., Didina, V. S., Zavilgelsky, G. B., & Manukhov, I. V. Antirestriction Protein ArdB (R64) Interacts with DNA // *Biochemistry*. 2020. V. 85, P. 318–325.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-380

**ВЛИЯНИЕ УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ MDM2 НА ФЕРМЕНТЫ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ НМРЛ ЧЕЛОВЕКА*****THE EFFECT OF MDM2 UBIQUITIN LIGASE ON ENERGY METABOLISM ENZYMES
IN CELL MODELS OF HUMAN NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

Е. А. Фефилова, О. Ю. Шувалов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E. A. Fefilova, O. Yu. Shuvalov

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ e.fefilova@list.ru

Аннотация

Целью данной работы было оценить влияние убиквитин-лигазы MDM2 на экспрессию ряда метаболических ферментов в клеточных моделях немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ)

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of the ubiquitin ligase MDM2 on the expression of a number of metabolic enzymes in cell models of non-small cell lung cancer.

Убиквитин-лигаза MDM2 является основным негативным регулятором онкосупрессора p53. Помимо этого, MDM2 также влияет на стабильность ряда важнейших онкосупрессоров и онкогенов, что может приводить к различным эффектам.

Одной из важнейших характеристик злокачественных клеток различного генезиса является их метаболическое перепрограммирование. В данном исследовании мы изучали влияние статуса MDM2 на ряд ферментов гликолиза, одноуглеродного метаболизма, а также их важнейших регуляторов как на транскрипционном, так и на белковом уровнях.

Мы использовали две клеточные модели НМРЛ человека — H1299 и A549. Важно отметить, что в линии H1299 наблюдается гомозиготная делеция гена, кодирующего онкосупрессор p53, в то время как в линии A549 экспрессируется p53 «дикого типа». При этом с использованием лентивирусной трансдукции мы создали линии H1299 и A549, сверхэкспрессирующие нативный белок MDM2 (обозначен как MDM2), каталитически-неактивный мутант MDM2 (Mut), а также контрольные клетки (трансдуцированные лентивирусом, несущим контрольный вектор pCDH).

Мы исследовали влияние убиквитин-лигазы MDM2 на экспрессию генов, кодирующих ключевые ферменты гликолиза (LDHA, Aldoa, PGK1), одноуглеродного метаболизма (SHMT2 и MTHFD2), а также их основные регуляторы — транскрипционные факторы c-Myc и ATF4.

С использованием ПЦР в «режиме реального времени» и иммуноблотинга мы показали, что в клеточной линии A549 оверэкспрессия MDM2 приводит к повышению количества изучаемых ферментов и транскрипционных регуляторов как на транскрипционном, так и на белковом уровнях. В то же время для линии H1299 наблюдалась обратная закономерность — оверэкспрессия MDM2 способствовала снижению их количества.

Таким образом, по-видимому, убиквитин-лигаза MDM2 может по-разному влиять на энергетический метаболизм в различных моделях НМРЛ. Крайне важно понять, зависит ли это от статуса p53. Полученные данные могут быть полезны в контексте противоопухолевой терапии, направленной на восстановление функций p53 в опухолевых клетках (ингибиторы p53-MDM2 взаимодействия).

* Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-75-10138.
© Е. А. Фефилова, О. Ю. Шувалов, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-381

**ОПТИМИЗАЦИЯ КОНСТРУКЦИИ ДНК-НАНОМАШИНЫ
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ 16S РРНК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS******OPTIMIZATION OF DNA-NANOMACHINE DESIGN FOR 16S RRNA *S.AUREUS* DETECTION**П. В. Филатов^{1,2}, Д. А. Горбенко^{1,2}, М. Ю. Березовская¹¹Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург²МНОЦ Физики Наноструктур, Университет ИТМО, Санкт-ПетербургP. V. Filatov^{1,2}, D. A. Gorbenko^{1,2}, M. Yu. Berezovskaya¹¹SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg²PhysNano, ITMO University, Saint Petersburg

✉ filatov@scamt-itmo.ru

Аннотация

S. aureus — один из основных возбудителей нозокомиальных инфекций, оказывающих негативное влияние на мировое здравоохранение. Хемилюминесцентные пероксидазоподобные ДНК-наномашин, интегрированные в оптические системы детекции — перспективный подход быстрого, чувствительного и селективного метода детекции патогенных микроорганизмов. Данная работа направлена на разработку оптимальной системы детекции 16S рРНК *S.aureus*.

Abstract

S. aureus is one of the major causative agents of nosocomial infections with a negative impact on global health. Chemiluminescent peroxidase-like DNA-nanomachine integrated into an optical detection system is a promising approach for a rapid, sensitive and selective method of pathogen detection. This work aims to develop an optimal detection strategy for 16S rRNA of *S.aureus*.

Нозокомиальные инфекции — это инфекции, которые приобретаются в медицинских учреждениях и оказывают значительное негативное влияние на мировое здравоохранение, так как они приводят к увеличению смертности пациентов, а также финансовым потерям государства. Распространенность этих инфекций варьируется в зависимости от региона, типа инфекции и медицинского учреждения. Так, например, в развитых странах на общее количество всех пациентов приходится 7 % случаев госпитальных инфекций, в развивающиеся — 10 % [1]. Поскольку эти инфекции приобретаются во время посещений больницы, они могут привести к длительному пребыванию в ней, инвалидизации и финансовому бремени [2]. Поэтому крайне важно своевременно выявить источник инфекции.

В настоящее время больницы и медицинские учреждения в основном используют традиционные методы обнаружения патогенных микроорганизмов: культивирование, тесты с использованием антител и молекулярные методы. Однако, эти подходы имеют критические ограничения: большая длительность (культивирование), низкая чувствительность (тесты с использованием антител), высокая стоимость (молекулярные методы, особенно полимеразная цепная реакция) [3]. В связи с этим, важно разработать новые стратегии, способные преодолеть вышеперечисленные недостатки.

Одной из перспективных стратегий в области обнаружения патогенных микроорганизмов являются хемилюминесцентные пероксидазоподобные ДНК-наномашин, интегрированные в оптический формат. Сочетание достоинств молекулярных конструкций [4], способа подачи реагентов и прибора по считыванию хемилюминесценции [5] позволяет получить гибкую, практически универсальную систему детекции нуклеиновых кислот. Однако, как и большинство концептуально свежих разработок, данная система имеет ряд недостатков, требующих оптимизации для получения наилучших результатов [6]. В частности, на начальном этапе необходимо разрабатывать несколько молекулярных конструкций ДНК-наномашин одновременно и сравнивать их по следующим параметрам: специфичность, лимит детекции, а также значение фонового сигнала.

В данной работе сравниваются несколько пероксидазоподобных ДНК-наномашин для обнаружения 16S рРНК *S.aureus*, который является одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций [7]. 16S рРНК была выбрана в качестве целевой мишени, поскольку является универсальным маркером патогенных бактерий,

* Авторы выражают благодарность Университету ИТМО. Мы также благодарим Министерство образования и науки Российской Федерации за № FSER-2022-0009 и программу «Приоритет-2030».

позволяющим различать даже близкородственные штаммы, что необходимо при дискриминации возбудителей инфекций [8].

В результате проделанной работы ожидается получение наиболее эффективной конструкции пероксидазоподобной ДНК-наномашин для обнаружения 16S рРНК *S.aureus* с оптимальным набором параметров, а также ее дальнейшая характеристика.

Литература

1. Khan H.A., Baig F.K., Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2017. Т. 7. №. 5. С. 478–482.
2. Booth N., Smith A. S. Infrared Detectors, 241–248 Goodwin House Publishers // New York & Boston. 1997.
3. Váradi L. et al. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future // Chemical Society Reviews. 2017. Т. 46. №. 16. С. 4818–4832.
4. Gorbenko D.A. et al. DNA nanomachine for visual detection of structured RNA and double stranded DNA // Chemical Communications. 2022. Т. 58. №. 35. С. 5395–5398.
5. Shang Q. et al. Ultrasensitive cloth-based microfluidic chemiluminescence detection of *Listeria monocytogenes* hlyA gene by hemin/G-quadruplex DNAzyme and hybridization chain reaction signal amplification // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2020. Т. 412. С. 3787–3797.
6. Kosman J., Juskowiak B. Bioanalytical application of peroxidase-mimicking DNAzymes: Status and challenges // Catalytically Active Nucleic Acids. 2020. С. 59–84.
7. Abdalhai M.H. et al. Rapid and sensitive detection of foodborne pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*) using an electrochemical DNA genomic biosensor and its application in fresh beef // Journal of agricultural and food chemistry. 2014. Т. 62. № 52. С. 12659–12667.
8. illumina: Identify and compare microbes from complex microbiomes or environments. URL: illumina.com. <https://www.illumina.com/areas-of-interest/microbiology/microbial-sequencing-methods/16s-rna-sequencing.html>.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-382

**ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК
НА ИНВАЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЛАНОМЫ МЫШИ*****EFFECT OF CIRCULATING CELL-FREE DNA
ON THE INVASIVE POTENTIAL OF MURINE MELANOMA**А. А. Филатова^{1,2}, Л. А. Алексеева¹, Н. Л. Миронова¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск²Новосибирский государственный университетA. A. Filatova^{1,2}, L. A. Alexeeva¹, N. L. Mironova¹¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk²Novosibirsk State University

✉ a.filatova2@gsu.ru

Аннотация

Внеклеточная ДНК опухолевого происхождения представляет особый интерес, поскольку может проникать в нормальные клетки и вызывать их трансформацию. ВнДНК, генерируемая клетками опухолевого микроокружения, также способна вызывать изменения, приводящие к формированию премеагастатической ниши, благоприятной для развития метастазов. В работе было исследовано влияние внДНК, источником которой были клетки меланомы и фибробласты, на клетки меланомы *in vitro* и *in vivo*.

Abstract

Tumor-derived cell-free DNA is of particular interest because it can enter normal cells and cause their transformation. cfDNA generated by cells of the tumor microenvironment is also capable of inducing changes leading to the formation of a premetastatic niche favorable for the development of metastases. In this work the effect of cfDNA derived from melanoma cells and fibroblasts, on melanoma was studied *in vitro* and *in vivo*.

Одним из активно развивающихся направлений молекулярной биологии и медицины является исследование внеклеточной ДНК (внДНК), циркулирующей в крови и других жидкостях организма. Анализ состава внДНК, отражающего состав клеток-источников, позволяет получить представление о течении заболевания пациента.

Несмотря на то, что предпринимаются попытки исследовать состав внДНК, выполнено не так много исследований, посвященных функциональной роли внДНК. Показано, что опухолеспецифическая ДНК способна влиять на нормальные нетрансформированные клетки, приводя к их трансформации, либо снижая их жизнеспособность. ВнДНК, генерируемая клетками микроокружения первичного опухолевого узла, включающими нейтрофилы и фибробласты, потенциально способна вызывать изменения, приводящие к формированию новых очагов опухолевого микроокружения и премеагастатической ниши, благоприятных для роста и развития метастазов. Однако исследования, посвященные изучению влияния внДНК, генерируемых как клетками опухоли, так и клетками опухолевого окружения, на опухолевые клетки практически отсутствуют.

Целью данной работы являлось изучение биологических эффектов, которые оказывает внДНК, выделенная из кондиционной среды клеток меланомы В16 мыши (cd-cfB16) и фибробластов мыши L929 (cd-L929), на клетки меланомы В16 *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* было показано снижение жизнеспособности и миграционных свойств клеток В16 в присутствии аутологичной внДНК cd-cfB16 в концентрациях 100 — 1000 нг/1 млн. кл. и повышение инвазивных свойств клеток меланомы в присутствии внДНК фибробластов cd-L929 в той же концентрации.

Для исследования влияния внДНК на клетки меланомы В16 *in vivo*, клетки В16 инкубировали с cd-cfB16 и cd-L929 в концентрации 100 нг/1 млн. кл. и вводили внутривенно или подкожно мышам линии С57В1 с метастатической моделью меланомы или моделью с опухолевым узлом, соответственно. Было показано, что обработка клеток В16 внДНК фибробластов cd-L929 с их последующей трансплантацией мышам (модель с опухолевым узлом) статистически достоверно не влияет на рост опухолевого узла. Тем не менее, медианное количество метастазов в группе мышей с метастатической меланомой, обработанной cd-L929, было выше, чем в контрольной группе мышей.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00289.

© А. А. Филатова, Л. А. Алексеева, Н. Л. Миронова, 2023

Важным результатом оказалось значительное уменьшение размеров опухолевого узла и количества метастазов в легких в группах мышей с опухолевым узлом и метастатической меланомой, соответственно, у которых клетки меланомы были предварительно обработаны вДНК клеток меланомы B16 cd-cfB16, в сравнении с контрольными группами. На метастатической модели меланомы было показано, что обработка клеток cd-cfB16 приводила к снижению количества поверхностных метастазов в легких с 50 в контрольной группе до 30. Несмотря на то, что снижение количества метастазов было статистически недостоверным относительно контрольной группы, тенденция к снижению видна и воспроизводима. На модели меланомы с опухолевым узлом было показано, что обработка клеток cd-cfB16 приводит к замедлению роста опухоли *in vivo*: так на 21 день эксперимента медианный размер опухоли в контрольной группе составил 0,58 см³, тогда как после обработки cd-cfB16 размер составил 0,25 см³. При сравнении выживаемости в группах мышей с опухолевым узлом было показано, что наибольшая выживаемость наблюдалась в группе мышей с меланомой, предварительно обработанной cd-cfB16.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что вДНК клеток меланомы и нетрансформированных фибробластов оказывает разное воздействие на опухолевые клетки: вДНК фибробластов стимулирует инвазивный потенциал опухоли, а вДНК меланомы (аутологичная вДНК) его подавляет. По всей вероятности, вДНК меланомы несет в своем составе сигнальные последовательности, заставляющие клетку впадать в апоптоз или подвергаться иным способам клеточной гибели. Одним из важных полученных результатов является доказательство того факта, что фибробласты, которые являются частью опухолевого окружения, могут вносить вклад в стимуляцию роста опухоли за счет вДНК.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-383

ИНДУКЦИЯ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОМ АРТРИТЕ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ *IN VITRO****INDUCTION OF ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOLOGICAL TOLERANCE BY REGULATORY T-CELLS IN COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS AND TRANSPLANTATION, *IN VITRO***

М. С. Фишер, А. С. Булыгин, В. В. Курилин, Ю. Н. Хантакова, С. В. Сенников

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

M. S. Fisher, A. S. Bulygin, V. V. Kurilin, Yu. N. Khantakova, S. V. Sennikov

Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ msolshanova@gmail.com

Аннотация

Индукция антиген-специфической иммунологической толерантности с помощью CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток (Т-рег), играет важную роль при отторжении пересаженных органов, реакциях «трансплантат против хозяина» и при аутоиммунных заболеваниях, и позволяет обеспечить снижение выраженности и частоты возникновения побочных реакций, связанных с системной иммуносупрессией при применении традиционной терапии.

Abstract

Induction of antigen-specific immunological tolerance with CD25 high FoxP3 hi T-regulatory cells (T-reg), plays an important role in organ transplant rejection, graft-versus-host disease, and autoimmune diseases, and helps to reduce the severity and incidence of adverse reactions associated with systemic immunosuppression in the use of traditional therapy.

Цель

Оценить способы получения Т-рег и их эффективность в модели коллаген-индуцированного артрита и при трансплантации *in vitro*.

Материалы и методы

В эксперименте использовали мышинные дендритные клетки (ДК), которые подвергались трансфекции ДНК плазмид, включающих ИЛ-10 и коллаген II типа; также, применялись нагруженные кожными антигенами ДК, полученные из костного мозга мышей линии Balb/c. Трансфицированные ДК и нагруженные антигенами ДК, ссаживали с CD4⁺спленоцитами в присутствии коллагена II типа и AS2863619 (ингибитор циклин-зависимых киназ 8/19), соответственно. Затем, для оценки эффективности полученных клеток, трансфицированные ДК вводились в модель антиген-коллаген индуцированного артрита, с последующей оценкой уровня антител к коллагену II типа и припухлостей лап экспериментальных животных. Во втором варианте — полученные антиген-специфические Т-рег Balb/c сокультивировали с ДК C57Bl/6 и CD4⁺ Balb/c, для оценки подавления пролиферации и индукции иммунологической толерантности. Эксперимент оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение

Показано, что при со-культивировании ДК трансфицированных ДНК-плазмидами rmaxIL-10 и rmaxCII и CD4⁺спленоцитов, относительное количество Т-рег было $18,02 \pm 1,85$ %, что значительно больше, чем в контрольной группе ДК без трансфекции $7,63 \pm 0,74$ %. При оценке припухлостей лап и уровней антител к коллагену II типа, было обнаружено достоверное снижение показателей в экспериментальных группах, по сравнению с контрольными группами. Стимулированные CD4⁺спленоциты нагруженными антигенами ДК, при добавлении AS2863619 показали увеличение относительного количества Т-рег $70,3 \pm 1,15$ %, по сравнению с контрольной группой стимулированных спленоцитов без добавления AS2863619 $5,36 \pm 0,72$ %. В смешанной культуре лимфоцитов было выявлено, что в присутствии не антиген-специфических Т-рег в 2,5 раза увеличивается пролиферация CD4⁺-Т-лимфоцитов Balb/c в ответ на добавление антигена C57Bl/6. Однако в присутствии антиген-специфиче-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-75-10089.

ских Т-рег, даже при добавлении антигенов С57В1/6, уровень пролиферации CD4+-Т-лимфоцитов Balb/c не отличается от контрольной группы.

Выводы

Индукция антиген-специфических Т-рег с помощью трансфицированных ДК или дифференцировка стимулированных CD4+спленоцитов в антиген-специфические Т-рег с помощью AS2863619 *in vitro*, позволяют получить достаточное количество Т-рег для модуляции иммунологической толерантности на определенные антигены, что в перспективе расширяет возможности для терапии с наименьшими негативными последствиями.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-384

**ПРОФИЛИРОВАНИЕ ИММУННЫХ КЛЕТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ХИМИОТЕРАПИИ*****SINGLE-CELL IMMUNE PROFILING OF BREAST CANCER PATIENTS UNDER CHEMOTHERAPY**А. А. Фролова^{1,2}, М. Р. Патышева^{1,2}, А. А. Федоров¹, М. А. Вострикова¹,
О. Д. Брагина¹, В. Ю. Коробейников¹, Т. С. Геращенко¹, Н. В. Чердынцева^{1,2}¹Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
²Томский государственный университетA. A. Frolova^{1,2}, M. R. Patysheva^{1,2}, A. A. Fedorov¹, M. A. Vostrikova¹,
O. D. Bragina¹, V. Yu. Korobeynikov¹, T. S. Gerashchenko¹, N. V. Cherdyntseva^{1,2}¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS
²Tomsk State University

✉ anastasiya10152@gmail.com

Аннотация

Основным методом системного лечения ТНРМЖ является химиотерапия. В настоящей работе была проведена оценка иммунного ландшафта крови больных ТНРМЖ с использованием технологии секвенирования единичных клеток в динамике неoadъювантной химиотерапии. Было показано, что под действием химиотерапии происходят динамические изменения популяционного состава, приводящие к активации адаптивного звена иммунной системы.

Abstract

The main method of TNBC systemic treatment is chemotherapy. In this work, the immune landscape of the blood of patients with TNBC was evaluated using single cell sequencing technology in the dynamics of neoadjuvant chemotherapy. It has been shown that under the influence of therapy, dynamic changes in the population composition occur, leading to the activation of the adaptive immune response.

Введение

Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) представляет собой наиболее агрессивный подтип рака молочной железы, характеризующийся отсутствием мишеней для воздействия гормональной или таргетной терапией вследствие отрицательной экспрессии к рецепторам стероидных гормонов и HER2/neu. Как результат, основным методом системного лечения является химиотерапия, однако, только у 30 % пациентов достигается патологический полный ответ после лечения [1]. Опухоли ТНРМЖ характеризуются высокой инфильтрацией иммунных клеток, которые, как известно, участвуют в реализации ответа на проводимое химиотерапевтическое лечение [2]. В настоящей работе мы оценили динамику популяционного состава и транскрипционные изменения циркулирующих иммунных клеток в ходе неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) пациенток с ТНРМЖ.

Материалы и методы

Образцы периферической крови были получены от 9 пациентов с гистологически верифицированным ТНРМЖ в трех точках: до химиотерапии, через 3 и 21 день после проведения 1 курса НАХТ. Мононуклеарные клетки крови были получены методом седиментации в градиенте плотности фикола (1,077г/см³) с последующей криоконсервацией полученных суспензий клеток до момента проведения секвенирования. Популяционный состав и транскрипционные характеристики иммунных клеток крови были определены методом секвенирования РНК единичных клеток с использованием технологии 10x Genomics для фиксированных мультиплексированных образцов на платформе Genolab M (GeneMind Biosciences, Китай). Биоинформатический анализ данных выполнялся с применением программ Seurat и SingleR.

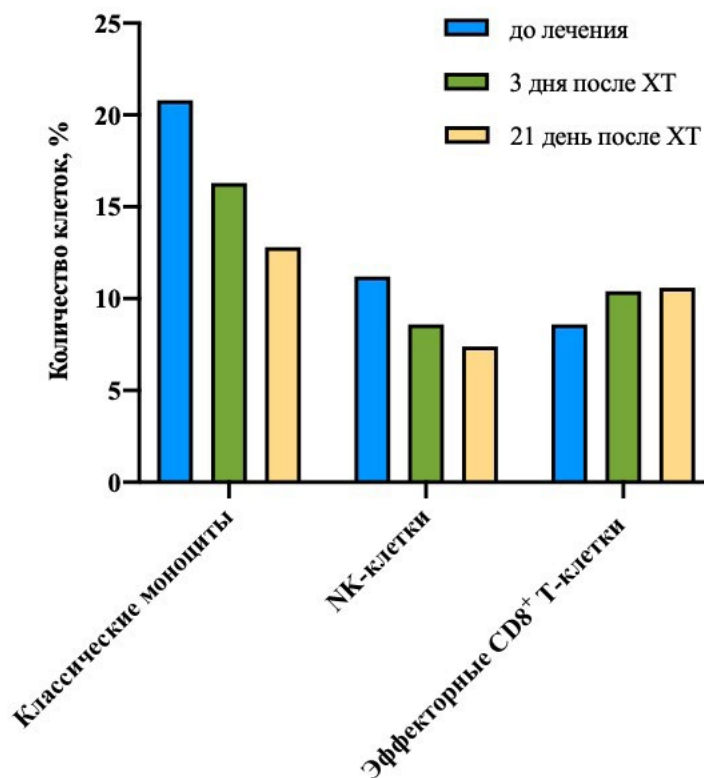
* Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (грант № 22-75-10128).

© А. А. Фролова, М. Р. Патышева, А. А. Федоров, М. А. Вострикова, О. Д. Брагина, В. Ю. Коробейников, Т. С. Геращенко, Н. В. Чердынцева, 2023

Результаты

В пуле мононуклеарных клеток периферической крови наблюдалось снижение функциональной активности клеток врожденной иммунной системы. Определено, что в ответ на проводимую терапию пул классических моноцитов и NK-клеток истощался вплоть до 21 суток (см. рисунок). Обнаружена повышенная экспрессия генов: *DDIT3*, *JUN*, *FOS*, *PPP1R15A* и др., вовлеченных в развитие состояния оксидативного стресса и апоптоза. Анализ сигнальных взаимодействий выявил супрессию TGF- β и MAP-киназного сигнальных путей, которые контролируют провоспалительную и цитолитическую активность данных клеточных популяций.

Интересно отметить, что в крови больных ТНРМЖ после НАХТ наблюдалась стимуляция адаптивного иммунного ответа. Количество эффекторных CD8⁺ Т-клеток увеличивалось к 21 суткам (см. рисунок). Отмечено повышение экспрессии генов *CXCR4*, *NFKB1A*, *KLRB1* и др., ассоциированных с формированием поверхностного белкового комплекса Т-лимфоцитов, ответственного за распознавание процессированных антигенов с главного комплекса гистосовместимости. Наблюдалась активация сигнальных путей адаптивного иммунного ответа и эффекторных функций Т-клеток, в том числе пути, с помощью которых Т-клетки могут взаимодействовать с антигеном.



Относительные пропорции иммунных клеток крови больных трижды негативным раком молочной железы в ходе НАХТ

Заключение

Для больных ТНРМЖ отмечено снижение функциональной активности врожденной иммунной системы при стимуляции работы эффекторных клеток адаптивного иммунитета на фоне проведения НАХТ.

Литература

1. Xia L. Y. et al. Survival outcomes of neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a meta-analysis of 36,480 cases // *World J Surg Oncol*. World J Surg Oncol, 2020. Vol. 18, № 1.
2. Galluzzi L. et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents // *Cancer Cell*. Cell Press, 2015. Vol. 28, № 6. P. 690–714.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-385

**СТАБИЛИЗАЦИЯ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ АПИКАЛЬНОГО ДОМЕНА GROEL
SM-ПОДОБНЫМ БЕЛКОМ ИЗ *SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS******STABILIZATION OF THE OLIGOMERIC STATE GROEL'S APICAL DOMAIN
BY SM-LIKE PROTEIN FROM *SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS***

А. Р. Хайретдинова, А. О. Михайлина, Н. В. Леконцева, В. В. Марченков, О. С. Никонов, В. А. Балобанов

Институт белка РАН, Пущино

A. R. Khairtdinova, A. O. Mikhaylina, N. V. Lekontseva, V. V. Marchenkov, O. S. Nikonov, V. A. Balobanov

Institute of Protein Research RAS, Pushchino

✉ khairtdinova.studies@gmail.com

Аннотация

Предложено использование гиперстабильного гомогептамерного Sm-белка из *S. Acidocaldarius* в качестве каркасного модуля для создания новых олигомерных белков. На основании этого модуля получен гибридный белок ADGroEL-SacSm. Исследование этого белка показывает сохранение структуры AD GroEL, сохранение эффективного связывания ненативных белков, а также расширение диапазона условий его активности за счет стабилизации гептамерной структуры.

Abstract

It is proposed the applying of hyperstable homoheptameric Sm-like protein from *S. acidocaldarius* as a scaffold module for the creation of new oligomeric proteins. Hybrid protein ADGroEL-SacSm was obtained based on this module. The study of this protein shows the conservation of the structure of AD GroEL, the conservation of effective binding of non-native proteins, as well as the expansion of the range of conditions for its activity due to the stabilization of the heptameric structure.

Бактериальный шаперон GroEL, образованный двумя гептамерными кольцами, является активно изучаемым белком на протяжении четырех десятков лет [1]. Известно, что в связывании с ненативными белками может участвовать внутренняя полость шаперона, а также его апикальный домен (AD GroEL) [2, 3]. В ранних исследованиях было показано, что шаперонную активность способен проявлять отдельный апикальный домен в мономерном виде [3], что натолкнуло нас на вопрос о том, влияет ли олигомеризация AD GroEL на эффективность его связывания с ненативными белками?

Данная работа направлена на выяснение роли олигомеризации шаперона GroEL в связывании с ненативными белками. Предложенный в работе подход позволяет сепарировать функцию связывания от других функций шаперона.

Перед нами была поставлена задача: стабилизировать апикальный домен GroEL в гептамерном состоянии. Для этого был спроектирован и получен гибридный белок ADGroEL-SacSm (см. рисунок), что позволило попутно избавиться от сайтов связывания АТФ и магния, а также внутренней полости GroEL, способной связывать пептиды.

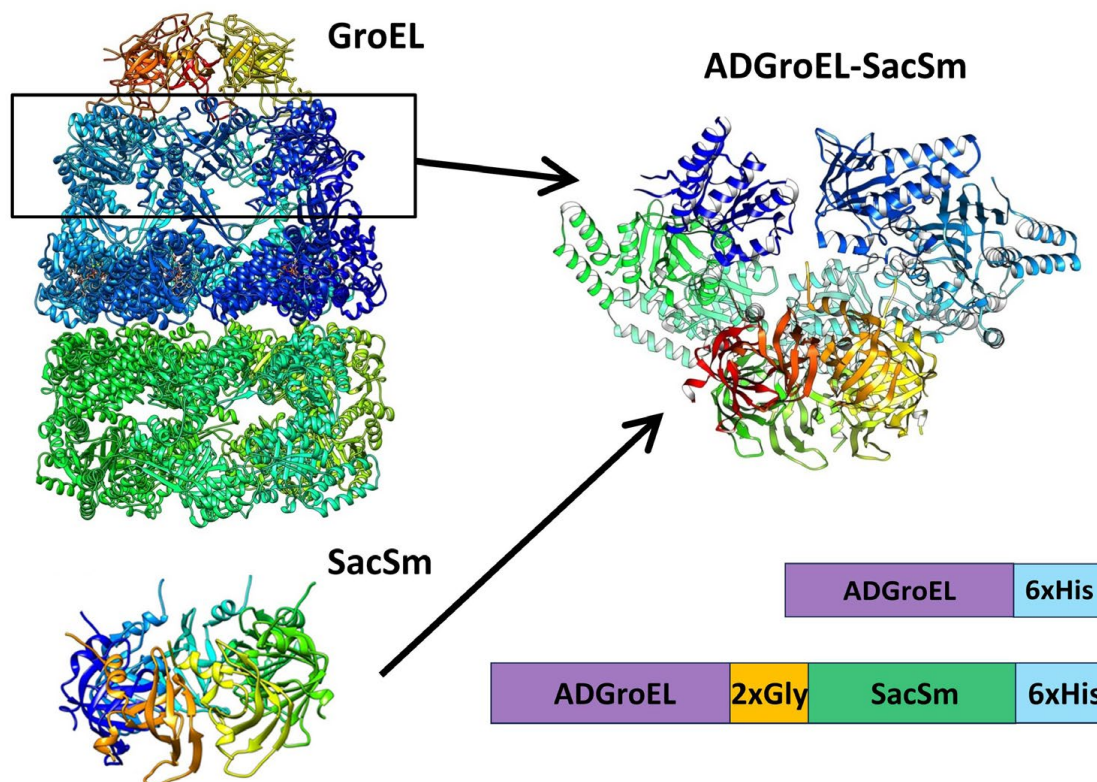
В качестве каркасного модуля мы использовали гомогептамерный Sm-белок из *S. Acidocaldarius* (SacSm), выполняющий роль РНК-шаперона архей [5]. В основе выбора лежала способность образовывать кольцевой гептамер, а также гиперстабильность структуры белка при высоких температурах и концентрациях денатурантов. Низкая стабильность AD GroEL относительно SacSm позволила влиять на структуру только апикального домена, не разрушая олигомерность гибридного белка.

Полученная стандартными генно-инженерными методами конструкция была экспрессирована в бактериальных клетках. Затем были подобраны условия для выделения синтезированного белка с последовательной контролируемой сборкой гептамера на этапе очистки. Спектроскопия кругового дихроизма и метод динамического рассеяния света использовали для изучения процессов сворачивания и разворачивания структур при изменении температуры и концентрации денатурантов. Последний в том числе использовался для оценки снижения степени агрегации белков в присутствии ADGroEL-SacSm. Оценка способности к связыванию ненативных белков производилась методом неденатурирующего электрофореза с использованием флуоресцентно-меченных белков.

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-24-00934.

© А. Р. Хайретдинова, А. О. Михайлина, Н. В. Леконцева, В. В. Марченков, О. С. Никонов, В. А. Балобанов, 2023

Результаты исследования показали принципиальную возможность использования модуля SacSm для стабилизации кольцевых гептамеров. Позволили получить ответ на вопрос, какие функции AD GroEL сохраняются при удержании его в олигомерной форме; препятствует ли тесное расположение апикальных доменов образованию их нативной структуры при одновременном сворачивании.



Структура нового гибридного гептамерного белка ADGroEL-SacSm, схематическое изображение последовательности его мономера

Литература

1. Kupper, M., Gupta, S.K., Feldhaar, H., Gross, R. Versatile roles of the chaperonin GroEL in microorganism–insect interactions // *FEMS Microbiology Letters*. 2014. V. 353. P. 1-10.
2. Kim, H., Park, J., Jun, S., Jung, M., Roh, S. Cryo-EM structures of GroEL:ES2 with RuBisCO visualize molecular contacts of encapsulated substrates in a double-cage chaperonin // *iScience*. 2022. V. 25. P. 103704.
3. Marchenkov, V.V., Semisotnov, G. V. GroEL-Assisted Protein Folding: Does It Occur Within the Chaperonin Inner Cavity? // *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. V. 10. P. 2066-2083.
4. Zahn, R., Buckle, A.M., Perrett, S., Fersht, A.R. Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL // *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*. 1996. V. 93. P. 15024–15029.
5. Lekontseva, N., Mikhailina, A., Fando, M., Kravchenko, O., Balobanov, V., Tishchenko, S., Nikulin, A. Crystal structures and RNA-binding properties of Lsm proteins from archaea *Sulfolobus acidocaldarius* and *Methanococcus vannielii*: Similarity and difference of the U-binding mode. *Biochimie*. 2020, V. 175. P. 1-12.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-386

СОЗДАНИЕ CRISPR/CAS9 ВЕКТОРА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ АДАМАЛИЗИНОПОДОБНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ГЕНОМЕ *BACILLUS PUMILUS* 3-19***ESTABLISHMENT OF CRISPR/CAS9 VECTOR FOR INACTIVATION OF EXTRACELLULAR ADAMALYSIN-LIKE METALLOPROTEINASE IN GENOME OF *BACILLUS PUMILUS* 3-19**

Д. И. Хасанов, Н. Л. Рудакова, Ю. А. Васильева, А. И. Гильмутдинова,
Е. Э. Ласточкина, Е. С. Волкова, М. Р. Шарипова

Казанский федеральный университет

D. I. Khasanov, N. L. Rudakova, Yu. A. Vasilyeva, A. I. Gilmutdinova,
E. E. Lastochkina, E. S. Volkova, M. R. Sharipova

Kazan Federal University

✉ hasda2149@gmail.com

Аннотация

Металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19 — первый бактериальный фермент-гомолог металлопротеиназ эукариот семейства астацинов и адамализинов среди внеклеточных протеаз бацилл. Для изучения роли фермента в микробной клетке необходимо исследовать, как инактивация его гена скажется на физиологии штамма. В настоящей работе сконструирован CRISPR/Cas9 вектор pKDm06.23 для получения делеционного мутанта *B. pumilus* 3-19 с инактивированным геном металлопротеиназы.

Abstract

B. pumilus 3-19 metalloproteinase is the first bacterial enzyme-homolog of eukaryotic metalloproteinases of the astacin and adamalysin families among extracellular proteases of bacilli. To study the role of an enzyme in cell, it is necessary to examine how the inactivation of its gene will affect the physiology of the strain. In this work, a CRISPR/Cas9 vector pKDm06.23 was constructed to obtain a mutant of *B. pumilus* 3-19 with an inactivated metalloproteinase gene.

Металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19 была впервые выделена и охарактеризована учеными Казанского федерального университета. Анализ первичной структуры показал, что новый фермент представляет собой первый бактериальный фермент-гомолог эукариотических металлопротеиназ семейства астацинов и адамализинов среди внеклеточных протеиназ бацилл, не имеющий гомологов среди других протеолитических ферментов прокариот [1, 2]. Эти семейства представлены в основном эукариотическими ферментами, играющими важную роль в жизни и здоровье человека. Представители данных семейств вовлечены в процессы развития эпителиальных тканей, регенерации, эмбриогенеза и т.д. Тем не менее, гиперпродукция этих ферментов может приводить к таким заболеваниям, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и др [3,4]. Также важно отметить, что все эукариотические адамализины являются мультидоменными белками. Однако каталитический домен является общим для всех представителей семейства. Структура активного центра металлопротеиназы *B. pumilus* высококонсервативна и уникально сочетает в себе признаки семейств астацинов с адамализинов. Мы предполагаем, что металлопротеиназа *B. pumilus* эволюционно является предковой формой для белков семейств адамализинов и астацинов, что формирует научный интерес к изучению функциональной роли исследуемого фермента у прокариот, а также к поиску потенциальных областей его применения.

Для изучения функций металлопротеиназы *B. pumilus* непосредственно в бактериальной клетке необходимо исследовать, как инактивация гена фермента скажется на физиологических характеристиках полученного делеционного мутанта в сравнении с нативным штаммом. Сравнительный анализ полученных данных позволит установить роль фермента в клетках *B. pumilus* 3-19.

Целью настоящего исследования явилось создание плазмидного вектора для целевой инактивации гена металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 (*mprBp*) с помощью технологии CRISPR/Cas9.

В настоящей работе нами использовался CRISPR/Cas9 вектор pJOE9282.1 [5]. Данный вектор характеризуется наличием температура-чувствительного ориджина репликации pE194^{ts} для клеток бацилл, ориджином

* Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 23-24-10059.

© Д. И. Хасанов, Н. Л. Рудакова, Ю. А. Васильева, А. И. Гильмутдинова, Е. Э. Ласточкина, Е. С. Волкова, М. Р. Шарипова, 2023

репликации рUC для *E.coli*, геном устойчивости к канамицину, эспрессирующимся как в клетках *E.coli*, так и в бациллярных клетках, и гена *cas9* под контролем ксилоза-индуцибельного промотора (P_{xyI}). Для работы системы редактирования генома CRISPR/Cas9 на данной плазмиде предусмотрены два сайта рестрикции для вставки направляющей последовательности (sgRNA) и фланкирующих участков гена-мишени для гомологичной рекомбинации. Для вставки последовательности sgRNA, направляющей эднуклеазу *cas9* к гену-мишени, вектор рJOE9282.1 предварительно расщепляли по сайту рестрикции *BsaI*. Последовательность sgRNA получили путем отжига двух праймеров и затем лигировали с рестрицированным вектором. Фланкирующие последовательности гена *mprBp* получали с геномной ДНК *B. pumilus* 3-19 методом ПЦР, после чего встроили по сайту *SfiI* в вектор рJOE9282.1. Наличие вставок sgRNA и фланкирующих последовательностей гена-мишени подтверждали методом ПЦР-анализа и секвенированием.

В результате проделанной работы был получен вектор рKDm06.23, который будет использован для трансформации в клетки *B. pumilus* 3-19 с целью получения делеционного мутанта с инактивированным геном внеклеточной адамализиноподобной металлопротеиназы.

Литература

1. Rudakova, N. L., Balaban, N. P., Danilova, Y. V., Rudenskaya, G. N., & Sharipova, M. R. (2010). Characteristics of a novel secreted zinc-dependent endopeptidase of *Bacillus intermedius*. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(10), 1294–1301. <https://doi.org/10.1134/s0006297910100123>
2. Sabirova, A. R., Rudakova, N. L., Balaban, N. P., Ilyinskaya, O. N., Demidyuk, I. V., Kostrov, S. V., Rudenskaya, G. N., & Sharipova, M. R. (2010). A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS letters*, 584(21), 4419–4425. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>
3. Zhong, S., & Khalil, R. A. (2019). A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease. *Biochemical pharmacology*, 164, 188–204. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.033>
4. Malesud C. J. (2019). Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS. *Biochemical pharmacology*, 165, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.033>
5. Altenbuchner J. (2016). Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. *Applied and environmental microbiology*, 82(17), 5421–5427. <https://doi.org/10.1128/AEM.01453-16>

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-387

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК СУБЪЕДИНИЦ ГЕТЕРОМЕРНЫХ
НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МАКРОФАГАХ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ЛИГАНДОВ*

INVESTIGATION OF CHANGES IN THE EXPRESSION OF MRNA SUBUNITS OF HETEROMERIC
NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN MACROPHAGES UNDER DIFFERENT TYPES
OF DIFFERENTIATION AND EXPOSURE TO VARIOUS LIGANDS

И. В. Холошенко^{1,2}, Е. А. Гондаренко¹, И. В. Шелухина¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

²Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

I. V. Kholoshenko^{1,2}, E. A. Gondarenko¹, I. V. Shelukhina¹

¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

²Mendeleev University of of Chemical Technology of Russia, Moscow

✉ innakholos5@gmail.com, gondarenkoea@gmail.com

Аннотация

Широкая распространенность и высокая смертность от сепсиса свидетельствует о том, что механизмы воспалительных процессов не до конца изучены и, как следствие, разработанные способы лечения сепсиса недостаточно эффективны. Значительный вклад в подавление сепсиса вносит холинергический противовоспалительный рефлекс, этот процесс также сопровождается изменением уровня экспрессии поверхностных белков-маркеров макрофагов, участвующих в воспалении и иммуносупрессии при сепсисе, что открывает новые возможности для создания медицинских препаратов. В данной работе мы показали роль $\alpha 9$ субъединиц nAChR на выработку противовоспалительных цитокинов.

Abstract

The widespread prevalence and high mortality from sepsis indicates that the mechanisms of inflammatory processes are not fully understood and, as a result, the developed methods for treating sepsis are not effective enough. Cholinergic anti-inflammatory reflex makes a significant contribution to the suppression of sepsis, this process is also accompanied by changes in the level of expression of surface protein markers of macrophages involved in inflammation and immunosuppression in sepsis, which opens up new possibilities for the creation of treatment. In this work, we have identified the role of $\alpha 9$ nAChR subunit in the production of anti-inflammatory cytokines.

Моноциты и макрофаги, продуцируя цитокины, играют центральную роль в патогенезе заболеваний воспалительной природы, например, сепсиса — опасной для жизни дисфункции органов, вызванной нерегулируемой иммунной реакцией организма на инфекцию. Активация гомопентамерного $\alpha 7$ nAChR макрофагов лежит в основе «холинергического противовоспалительного пути», однако функциональная роль гетеропентамерных nAChR (состоящих из комбинации α и β субъединиц) в макрофагах остается практически неизученной.

Целью данного проекта стало изучение влияния ингибирования гетеромерных nAChR на экспрессию мРНК субъединиц nAChR в различных функциональных состояниях макрофагов.

В настоящей работе методом ПЦР в реальном времени была обнаружена экспрессия мРНК различных субъединиц nAChR на модельных клеточных линиях макрофагов (THP-1 и U937) в неактивированном состоянии, а также при их поляризации. Чтобы оценить изменения обнаруженной экспрессии мРНК ряда субъединиц гетеромерных nAChR, клетки инкубировали с различными селективными антагонистами nAChR: α -конотоксинами RgIA, МП и α -кобратоксином СТХ. Наиболее ярко выраженным результатом стало увеличение экспрессии мРНК $\alpha 9$ субъединицы при ингибировании $\alpha 9\alpha 10$ рецептора на неактивированных макрофагах М0 линии U937 селективным антагонистом RgIA. При классической активации макрофагов (LPS/IFN- γ -индуцированная активация), приводящей к поляризации их созревания в направлении провоспалительных М1-клеток, повышалась экспрессия мРНК $\alpha 9$ и $\beta 2$ субъединиц nAChR.

Таким образом, наблюдаемое увеличение экспрессии $\alpha 9$ -содержащих nAChR может способствовать известной роли этого рецептора в ингибировании выработки провоспалительных цитокинов.

* Работа поддержана грантом РФФ № 22-24-00769.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-388

ВЫСОКАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ С ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ЯИЧНИКОВ

HIGH DIAGNOSTIC YIELD OF WHOLE-EXOME SEQUENCING IN ADOLESCENT GIRLS WITH PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY

П. Н. Цабай, Н. С. Павлова, З. Х. Кумыкова, З. К. Батырова, А. С. Большакова, Е. В. Уварова, Д. Ю. Трофимов

*Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, Москва*

P. N. Tsbai, N. S. Pavlova, Z. Kh. Kumyкова, Z. K. Batyrova, A. S. Bolshakova, E. V. Uvarova, D. Yu. Trofimov

*National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow*

✉ polinatsabai@gmail.com

Аннотация

Преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ) — хроническое заболевание с гетерогенной этиологией. 70 % случаев ПНЯ считались идиопатическими до широкого внедрения полноэкзомного секвенирования (ПЭС). Нами проведен поиск вариантов в генах, ассоциированных с нарушениями функции яичников, у девочек-подростков с нарушениями менструального цикла методом ПЭС. В 33 % случаев выявлена генетическая предрасположенность к ПНЯ.

Abstract

Premature ovarian insufficiency (POI) is a chronic disease with a heterogeneous etiology. 70 % of POI cases were considered idiopathic before the widespread use of whole exome sequencing (WES). We searched for variants in the genes associated with ovarian dysfunction in adolescent girls with menstrual irregularities using WES. In 33 % of cases, a genetic predisposition to POI was revealed.

Актуальность

Преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ) — хроническое нарушение репродуктивной функции с гетерогенной этиологией, критериями которого являются олиго- или аменорея в течение не менее чем 4 месяцев и уровень ФСГ при двух последовательных измерениях с временным интервалом более 4 недель, превышающий 25 ЕД/л, у женщины моложе 40 лет [1]. Заболеваемость составляет до 3,7 % среди женщин [2]. В своем крайнем проявлении ПНЯ наблюдается у девочек-подростков. Среди девушек до 20 лет частота ПНЯ оценивается как 1 на 10 000 девушек. ПНЯ ассоциирована с сокращением продолжительности жизни и низкой вероятностью спонтанного наступления беременности [1].

Этиология ПНЯ разнообразна и включает ятрогенные причины (последствия химио- и лучевой терапии, хирургических вмешательств на органах малого таза и брюшной полости), аутоиммунные, инфекционные, а также генетически обусловленные заболевания. Хромосомные нарушения объясняют около 50 % случаев первичной аменореи у подростков и 13 % случаев вторичной аменореи среди девушек моложе 30 лет, еще порядка 6 % всех случаев ПНЯ обусловлены премутацией (55-200 CGG-повторов) в гене *FMR1*. Однако после исключения вышеперечисленных причин до 70 % случаев ПНЯ остаются идиопатическими. По данным эпидемиологических исследований, генетическая компонента играет решающую роль в детерминации возраста менопаузы [3]. В последние годы с развитием высокопроизводительного секвенирования многие казавшиеся идиопатическими случаи ПНЯ были связаны с вариантами в генах, ассоциированных с нарушениями функции яичников и гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси.

Цель

Провести поиск вариантов в генах, ассоциированных с функцией яичников и ПНЯ, у девочек-подростков с подтвержденным или подозреваемым диагнозом ПНЯ, методом полноэкзомного секвенирования.

Материалы и методы

В Институте репродуктивной генетики НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова было проведено полноэкзомное секвенирование (ПЭС) 20 девочкам-подросткам 10–17 лет, обследованным во 2-м гинекологическом отделе-

нии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Однояйцевому сибсу одной из пациенток диагноз подтверждали методом секвенирования по Сенгеру обнаруженных у сестры вариантов. Критериями отбора для ПЭС были диагноз ПНЯ, олиго- или аменорея, задержка полового развития, отсутствие в анамнезе детских онкологических заболеваний, хирургических вмешательств на органах малого таза и брюшной полости, нормальный женский кариотип и нормальное количество CGG-повторов в гене *FMRI* (<55).

Результаты

Средний возраст на момент диагноза составил 14,4 года. У 8 девочек отмечался гипергонадотропный гипогонадизм, у 2 — гипогонадотропный гипогонадизм (синдром Кальманна). В 3 случаях семейный анамнез был отягощен: в 2 семьях у родственниц отмечалась ранняя менопауза или ПНЯ, в 1 семье у матери пациентки аномальные маточные кровотечения (АМК). По результатам ПЭС у 10 девочек (10/21, 47,6 %) были найдены варианты в генах, ассоциированных с гипер- и гипогонадотропным гипогонадизмом и дисфункцией яичников. В 4 случаях (включая однояйцевых близнецов) обнаружены варианты в генах, ассоциированных с синдромальной патологией, сопровождающейся ПНЯ: синдромы Вудхауса — Сакати (ген *DCAF17*), блефарофимоза-птоза-обратного эпиканта (ген *FOXL2*), Малуфа (ген *LMNA*). У 1 пациентки с гипогонадотропным гипогонадизмом подтвержден *FGFR1*-ассоциированный синдром Кальманна. В 2 случаях была найдена моногенная причина изолированной ПНЯ (гены *GDF9* и *STAG3*). В 1 случае нарушения менструального цикла можно связать с предрасположенностью к аденомам гипофиза (ген *AIP*). В оставшихся двух случаях девочки были носительницами вариантов в генах *MRPS22* и *CYP21A2*, которые ассоциированы с аутосомно-рецессивными заболеваниями. ПЦР-исследование частых мутаций в гене *CYP21A2* не выявило второй вариант у пациентки.

Заключение

ПЭС позволило уточнить причину ПНЯ у 7 (7/21, 33 %) девочек-подростков, у которых рутинные обследования (кариотип, число повторов в гене *FMRI*) не выявили нарушений. Только у одной из них семейный анамнез был отягощен по АМК у матери. Таким образом, ПЭС эффективно для определения молекулярно-генетических нарушений у девочек-подростков с ПНЯ даже при отсутствии семейного накопления заболевания.

Литература

1. ESHRE Guideline Group on POI, Webber, L., Davies, M., et al. (2016). ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 31(5), 926–937.
2. Golezar, S., Ramezani Tehrani, F., Khazaei, S., et al (2019). The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis. *Climacteric*, 22(4), 403–411.
3. Cloke, B., & Rymer, J. (2021). Premature ovarian insufficiency—the need for a genomic map. *Climacteric*, 24(5), 444–452.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-389

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ
НОВЫХ ОРТОНАЙРОВИРУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛИХОРАДКОЙ У ЛЮДЕЙ****STRUCTURAL RESEARCH OF NUCLEOPROTEINS
OF NEW ORTHONAIROVIRUSES ASSOCIATED WITH HUMAN FEVER**А. А. Цишевская^{1,2}, В. Ю. Тюрин¹, А. Е. Тишин¹, И. Р. Иматдинов¹, А. В. Гладышева¹¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
²Новосибирский государственный университетA. A. Tsishevskaya^{1,2}, V. Yu. Turin¹, A. E. Tishin¹, I. R. Imatdinov¹, A. V. Gladysheva¹¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo
²Novosibirsk State University

✉ glastas707@gmail.com

Аннотация

Ортонайровирусы, переносимые клещами, считаются серьезной угрозой для здравоохранения во всем мире. Помимо вируса ККГЛ, за последние три года появились Beiji nairovirus, Yezo virus и Songling virus ассоциированные с лихорадкой у людей. В ходе данного исследования произведен структурный анализ, созданы искусственные гены, экспрессирующие вектора и рекомбинантные нуклеопротеины этих вирусов для структурных исследований с использованием ИСИ.

Abstract

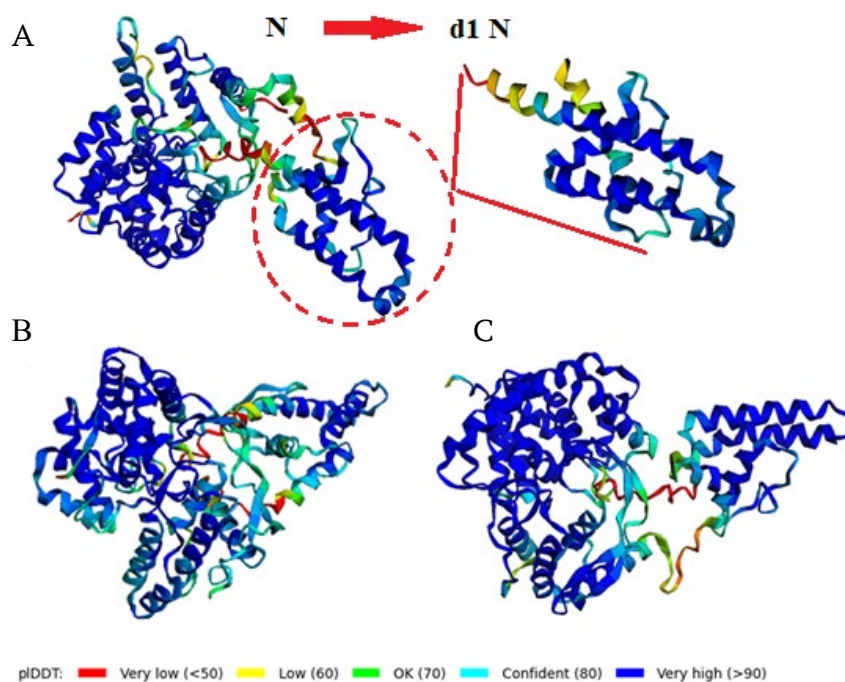
Tick-borne orthonairoviruses are considered a serious threat to public health worldwide. In addition to the CCHF virus, in the last three years, the Beiji nairovirus, Yezo virus and Songling virus associated with fever in humans have appeared. In the course of this study, a structural analysis was performed, synthetic genes expressing vectors and recombinant nucleoproteins of these viruses were created for structural studies using a SRS.

За последние 5 лет при помощи метагеномного секвенирования обнаружено большое количество новых вирусов, которые могут представлять потенциальную угрозу для человека и требуют детального изучения. С этой целью был произведен анализ научных статей об обнаружении новых вирусов начиная с 2021 г., баз данных GenBank и PDB, собственных результатов секвенирования и в результате отобраны три новых ортонайровируса Beiji nairovirus (BJNV), Yezo virus (YEZV) и Songling virus (SGLV), представляющих серьезную угрозу для здравоохранения и остающихся почти не изученными.

На сегодняшний день известно о 8 случаях заражения людей YEZV после укуса клеща (8 — YEZV), 130 — BJNV, один из которых привел к смерти пациента, и 42 — SGLV. Единичные контиги нуклеотидных последовательностей этих вирусов были обнаружены на территории РФ. Общие симптомы у инфицированных пациентов включали лихорадку, головную боль, депрессию, в некоторых случаях комму. При этом информация о структурных особенностях вириона и вирусных белков данных вирусов, являющейся ключевой для рациональной разработки эффективных вакцин и противовирусных препаратов, полностью отсутствует, а первые полногеномные последовательности этих вирусов в базе данных GenBank депонированы только в 2021 г.

Таким образом, целью данной работы являлся биоинформатический анализ, конструирование синтетических генов и создание рекомбинантных нуклеопротеинов Beiji nairovirus, Yezo virus, Songling virus для разрешения их пространственной структуры.

На первом этапе работы по базе данных PDB в BLAST и с помощью программы PROTOMENAL был произведен поиск гомологичных структур и предсказаны предполагаемые функциональные домены всех вирусных белков исследуемых объектов. На основе чего, в качестве первой мишени для исследования, были выбраны нуклеопротеины (N) BJNV, YEZV, SGLV, которые обладали одним функциональным доменом и уровнем идентичности с белками с известными структурами ~ 30 %. С помощью AlphaFold2 были получены модели структуры N BJNV, N YEZV, N SGLV с коэффициентами достоверности pLDDT 81.30, 86.85 и 86.45, соответственно. Все модели являлись высокоструктурированными и имели два пространственно-разделенных домена, в основном представленных альфа спиралями и соединённых между собой свободными петлями, что указывает на их пригодность для рентгеноструктурного анализа.



Структуры белков с цветовым кодированием pLDDT AlphaFold2:
 A — полноразмерный N YEZV и d1 N YEZV; B — N BJNV; C — N SGLV

На втором этапе работы была произведена *de novo* сборка нуклеотидных последовательностей целевых генов, кодирующих нуклеопротеины исследуемых объектов. Дизайн производили таким образом, чтобы получить полноразмерные нуклеопротеины и отдельные домены, не содержащие свободных петель со стороны С и N концов. В итоге были получены искусственные гены домена 1 (d1) N YEZV длиной 384 п.н., полноразмерного N YEZV — 1509 п.н., полноразмерного N BJNV — 1659 п.н. и полноразмерного N SGLV — 1458 п.н.

После сборки целевых генов были получены рекомбинантные плазмиды 6xHis-pET-3C-Yezo_virus_N и 6xHis-pET-3C-Yezo_virus_d1N, обеспечивающие экспрессию полноразмерного N и d1 N YEZV в прокариотической системе *E. Coli* и содержащие вставки, кодирующие аминокислотные последовательности целевого белка и пептида слияния для протеолитического отщепления 6xHis пикорнаином 3C, длиной 546 а.о. и 170 а.о. А также получены рекомбинантные плазмиды B2k_8xHis-TEV-Beiji nairovirus_N и B2k_8xHis-TEV-SongLing virus_N, обеспечивающие экспрессию химерных вариантов N BJNV и N SGLV в прокариотической системе *E. Coli* и содержащие вставки, кодирующие аминокислотные последовательности целевых белков длиной 732 а.о. и 484 а.о. после отщепления аффинной 8xHis метки TEV-протеазой. Далее после наработки биомассы и двух последовательных ИМАС хроматографии были получены рекомбинантные белки N YEZV молекулярной массой $56.2 \cdot 10^5$ дальтон (Да), d1 N YEZV — $14.2 \cdot 10^5$ Да, N BJNV — $61 \cdot 10^5$ Да и N SGLV — $54.2 \cdot 10^5$ Да без аффинных меток и белков слияния с чистотой более 95 % для дальнейших структурных исследований экспериментальными методами, в частности с использованием источников синхротронного излучения.

Таким образом, в результате данной работы произведен структурный анализ, созданы искусственные гены, экспрессирующие вектора и рекомбинантные нуклеопротеины трех новых ортонайровирусов, представляющих серьезную угрозу для здравоохранения. Эти данные далее будут использованы для экспериментального решения их структуры, что является принципиально важным для установления тонкого устройства вириона и спецификации взаимодействия вирусных белков при инфекционном процессе.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-390

**КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА IV СТАДИИ
НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ГЕНОВ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ ***

**COMBINED TREATMENT OF PATIENTS WITH STAGE IV GASTRIC CANCER BASED
ON ASSESSMENT OF CHEMOSENSITIVITY AND ABC TRANSPORTER GENE EXPRESSION LEVELS**

И. А. Цыденова^{1,2}, В. А. Маркович¹, Е. А. Кравцова^{1,2}, Д. С. Долгашева^{1,2}, М. М. Цыганов¹, Н. В. Литвяков¹⁻³

¹Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

²Томский государственный университет

³Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск

I. A. Tsydenova^{1,2}, V. A. Markovich¹, E. A. Kravtsova^{1,2}, D. S. Dolgasheva^{1,2}, M. M. Tsyganov¹, N. V. Litviakov¹⁻³

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS

²Tomsk State University

³Siberian State Medical University, Tomsk

✉ tsydenova422@gmail.com

Аннотация

Метастатическим опухолям, как известно, свойственна гетерогенность между первичными и метастатическими очагами. Такой тип гетерогенности является причиной низкой эффективности терапии. В связи с этим сравнительный анализ экспрессии генов АВС-транспортеров и генов химиочувствительности позволит определить резистентность и чувствительность опухоли к терапии и дать основу для персонализированного подхода в лечении.

Abstract

Metastatic tumours are known to have heterogeneity between primary and metastatic sites. This type of heterogeneity is the cause of low efficacy of therapy. In this regard, comparative analysis of ABC-transporter gene expression and chemosensitivity genes will make it possible to determine the resistance and sensitivity of tumours to therapy and provide a basis for a personalised treatment approach.

Перитонеальный канцероматоз является крайне неблагоприятным вариантом прогрессирования рака желудка (РЖ). Предпринимаются значительные усилия, чтобы понять механизм этой устойчивости и улучшить результаты лечения.

Цель исследования

Оценка эффективности персонализированного назначения химиотерапии на основе анализа межсайтовой гетерогенности экспрессии генов семейства АВС-транспортеров и генов химиочувствительности при комбинированном лечении больных раком желудка IV стадии с перитонеальным канцероматозом [1].

Материалы и методы

В исследование включено 70 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом РЖ IV стадии. В контрольную группу (n=35) были включены больные, которым выполнялась циторедуктивная операция с последующей стандартной послеоперационной химиотерапией по схеме FOLFOX. В основную группу было проспективно включено 35 пациентов, которым выполнялась циторедуктивная операция, затем проводилась персонализированная системная и интраперитонеальная химиотерапия. Для исследования был использован операционный материал (опухольная ткань желудка, неизмененная ткань желудка, канцероматоз, материал метастаза в лимфатический узел). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии генов АВС-транспортеров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и генов химиочувствительности: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптаной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе

* Работа выполнена при поддержке гранта Минобр. РФ 075-15-2021-1073.

© И. А. Цыденова, В. А. Маркович, Е. А. Кравцова, Д. С. Долгашева, М. М. Цыганов, Н. В. Литвяков, 2023

Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0».

Результаты

Выявлен высокий уровень экспрессионной гетерогенности у пациентов с РЖ. Сравнение экспрессии генов семейства ABC-транспортёров продемонстрировало, что только ген *ABCC1* показал статистически значимую разницу в уровне экспрессии между исследуемыми сайтами по каждому пациенту. Среди генов химиочувствительности гиперэкспрессия в этих тканях была характерна только для *TOP2a* ($17,2 \pm 5,9$; max 161,9; $10,8 \pm 4,1$; max 105,1; $35,3 \pm 0,8$; max 439,6 соответственно). Аналогичные результаты получены для *BRCA1*. Достоверные различия в уровне экспрессии наблюдаются между опухолевой тканью и канцероматозом ($p = 0,005$) и метастазом в ЛУ и канцероматозом ($p = 0,01$).

Схемы назначения в зависимости от уровня экспрессии генов химиочувствительности в разных сайтах были следующими: FOLFIRI + C; TRFL + C; XELIRI + C; PC; GemCap + C. Сроки наблюдения за больными составили от 10 до 37,9 мес. В основной группе медиана времени без прогрессирования (ВВП) составила 15,8 мес, с интерквартильным размахом (13,5–19,1), в группе контроля — 11,2 (10,3–11,6) мес ($p < 0,001$; $\chi^2 = 47,662$). Медиана общей выживаемости (ОВ) в основной группе составила 18,7 мес, с интерквартильным размахом (15,0–24,3), в контрольной группе — 12,7 (11,3–13,1) мес ($p < 0,001$; $\chi^2 = 50,731$). В основной группе удалось достичь 1-летней выживаемости у 35 (100 %), 2-летней — у 9 (27 %), 3-летней — у 1 (3 %) пациента. В группе контроля показатели двух- и трехлетней выживаемости не получены, срок одного года после завершения лечения пережили 29 (87 %) больных, у остальных ($n=6$) пациентов продолжительность жизни менее 1 года. В основной группе даже при разделении на подгруппы, в зависимости от получаемой комбинации цитостатиков, отмечены значимые различия по сравнению с пациентами контрольной группы, которым проводилась эмпирически назначенная схема FOLFOX. Наилучшая выживаемость наблюдалась у пациентов ($n=14$), получавших персонализированно назначенную схему FOLFIRI с интраперитонеальным введением цисплатина. Из них 6 больных живы и находятся под наблюдением, в том числе 5 — без признаков прогрессирования. Медиана общей выживаемости в этой подгруппе, составила 22,2 (15,9–28,4) мес.

Выводы

Разработанный метод лечения рака желудка с перитонеальным канцероматозом на основе анализа уровня экспрессии генов химиочувствительности и ABC-транспортёров позволяет улучшить отдаленные результаты комбинированного лечения в виде значимого увеличения медианы ВВП и ОВ

Литература

1. Маркович В. А., Тузиков С. А., Родионов Е. О., Попова Н. О., Цыганов М. М., Миллер С. В., Подолько Д. В., Цыденова И. А., Ибрагимова М. К., Литвяков Н. В. Комбинированное лечение больных раком желудка IV стадии с канцероматозом брюшины. Сибирский онкологический журнал. 2023; 22(1): 24–34. — doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-1-24-34

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-391

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ С ПЕПТИДНЫМИ ИНГИБИТОРАМИ*****KINETIC PARAMETERS DETERMINATION OF THE INTERACTIONS
BETWEEN CYSTEINE CATHEPSINS AND PEPTIDE INHIBITORS**О. Е. Чепикова^{1,2}, А. И. Петушкова^{1,2}, И. В. Родионов¹, Н. В. Гороховец¹, А. А. Замятнин-мл.¹⁻⁴, Л. В. Савватеева¹¹*Институт трансляционной медицины и биотехнологии Научно-технологического парка биомедицины
Сеченовского университета, Москва*²*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*³*Факультет биоинженерии и биоинформатики,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*⁴*НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*O. E. Chepikova^{1,2}, A. I. Petushkova^{1,2}, I. V. Rodionov¹, N. V. Gorokhovets¹, A. A. Zamyatnin Jr¹⁻⁴, L. V. Savvateeva¹¹*Institute of Translational Medicine and Biotechnology,
Biomedical Science & Technology Park, Sechenov University, Moscow*²*Sirius University of Science and Technology, Sochi*³*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University*⁴*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University*

✉ chepikovaolga@gmail.com

Аннотация

Избыточная активность цистеиновых катепсинов в микроокружении опухоли вызвана нарушением механизмов их регуляции. Эндогенные ингибиторы катепсинов могут подвергаться гидролизу ферментами. В данном исследовании изучены особенности взаимодействия ковалентного и нековалентного пептидных ингибиторов, проявляющих противоопухолевые активности, с рекомбинантными цистеиновыми катепсинами S и L человека.

Abstract

Excess of cysteine cathepsins activity in tumor microenvironment is caused by violation of their regulation mechanisms. Proteolytic enzymes can hydrolyze endogenous cathepsin inhibitors cystatins. In this study, the interactions between exogenous covalent or non-covalent peptide inhibitors with antitumor activity and recombinant human cysteine cathepsins S and L were studied.

Цистеиновые катепсины — это папаин-подобные протеиназы, которые содержат в своем активном центре каталитическую триаду Cys-His-Asp. Их основной функцией в клетках является деградация белков в лизосомах и эндосомах. Однако катепсины были обнаружены и в других органоидах клетки, а также во внеклеточной среде. При онкогенезе цистеиновые катепсины выявляют в микроокружении опухолей, где эти ферменты участвуют в процессах пролиферации, инвазии и метастазирования, обеспечивая деградацию внеклеточного матрикса, разрушение межклеточных взаимодействий и стимулируя ангиогенез [1]. Избыточная активность цистеиновых катепсинов в микроокружении опухоли вызвана нарушением механизмов их регуляции. Эндогенные ингибиторы катепсинов (цистатины) могут подвергаться гидролизу протеолитическими ферментами, поэтому поиск экзогенных ингибиторов катепсинов является перспективным направлением в разработке новых противоопухолевых средств [2]. Катепсины S и L являются потенциальными терапевтическими мишенями при злокачественных опухолях [3].

Основная задача при поиске современных противоопухолевых средств заключается в разработке таргетных препаратов. Данная работа посвящена исследованию особенностей взаимодействия рекомбинантных цистеиновых катепсинов S и L с пептидными ингибиторами, обладающими противоопухолевыми активностями. В качестве ковалентного ингибитора был использован пептидный субстрат Ac-PLVE-FMK, сшитый с реактивной группой флуорометилкетон (ФМК), который ранее показал свою эффективность против катепсинов B и L [4]. В качестве нековалентного ингибитора — пептид с последовательностью FFSFGGAL, который был получен

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-25-00648.

на основе аминокислотной последовательности белка Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large). Обработка опухолевых клеток почки 769P этим ингибитором вызывала апоптоз [5].

Рекомбинантные катепсины S и L, содержащие 6 гистидиновых остатков на С-конце, в растворимой форме в виде проферментов были получены в бактериальной системе экспрессии. Выделение ферментов проводили из сырых лизатов клеток с последующей очисткой методами аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Для получения зрелых активных катепсинов S и L из соответствующих проферментов были подобраны условия их активации (инкубация при 37°C в ацетатном буфере). Ингибирующую активность и параметры ингибирования соединений Ac-PLVE-FMK и FFSFGAL по отношению к зрелым катепсином S и L определяли с использованием тест-системы *in vitro* фермент-субстрат-ингибитор. В основе тест-системы был использован пептидный субстрат Ac-QLLR-AMC, сшитый с флуоресцентной молекулой 7-амино-4-метилкумарина (AMC).

В результате работы были определены условия оптимального взаимодействия *in vitro* ингибиторов с сайтами связывания катепсинов S и L, а именно: концентрации полумаксимального ингибирования и их зависимости от времени инкубации, константы ингибирования, скорость инактивации. Также определены механизмы ингибирования для ковалентного и нековалентного ингибитора. Полученные результаты расширяют знания о специфичности цистеиновых катепсинов и будут использованы для детального изучения механизма их взаимодействия с ингибиторами, а также, в перспективе, создания высокоспецифичного препарата для терапии раковых опухолей.

Литература

1. Petushkova A. I., Savvateeva L. V., Korolev D. O., Zamyatnin Jr. A. A. Cysteine cathepsins: potential applications in diagnostics and therapy of malignant tumors // *Biochemistry (Mosc)*. 2019. V. 84 (7). P. 746–761.
2. Lee Y. T., Tan Y. J., Oon C. E. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity // *European journal of pharmacology*. 2018. V. 834. P. 188–196.
3. Rudzińska M., Parodi A., Soond S. M., Vinarov A. Z., Korolev D. O., Morozov A. O., Daglioglu C., Tutar Y., Zamyatnin Jr. A. A. The role of cysteine cathepsins in cancer progression and drug resistance // *International journal of molecular sciences*. 2019. V. 20(14). P. 3602.
4. Rudzińska M., Parodi A., Maslova V. D., Efremov Y. M., Gorokhovets N. V., Makarov V. A., Popkov V. A., Golovin A. V., Zernii E. Y., Zamyatnin Jr. A. A. Cysteine cathepsins inhibition affects their expression and human renal cancer cell phenotype // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12(5). P. 1310.
5. Soond S. M., Savvateeva L. V., Makarov V. A., Gorokhovets N. V., Townsend P. A., Zamyatnin Jr. A. A. Cathepsin S Cleaves BAX as a novel and therapeutically important regulatory mechanism for apoptosis // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13(3). P. 339.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-392

КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ SNPS TNFRSF11B И TNFA У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ БАШКИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ**COMBINATIONS OF SNPS TNFRSF11B AND TNFA GENOTYPES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS OF THE BASHKIR POPULATION IN CHELYABINSK REGION**

Ю. В. Чумачёва, Д. С. Сташкевич

Челябинский государственный университет

Yu. V. Chumacheva, D. S. Stashkevich

Chelyabinsk State University✉ miraculouslilac@yandex.ru**Аннотация**

Гены цитокинов влияют на характер иммунного ответа при ревматоидном артрите (РА) через уровень продукции кодируемых белков, что делает функциональный полиморфизм генов цитокинов особенно интересным для исследования при РА. В нашем исследовании мы провели оценку частот сочетаний генотипов полиморфизмов генов TNFRSF11B в точке G1181C и TNFA в точках G-308A, G-238A у популяции башкир больных РА и контрольной группы для выявления возможных ассоциаций.

Abstract

Cytokine genes influence the nature of the immune response in rheumatoid arthritis (RA) through the level of production of encoded proteins, which makes the functional polymorphism of cytokine genes particularly interesting for research in RA. In our study, we evaluated combinations of frequencies of combinations genotype of polymorphisms of TNFRSF11B genes at point G1181C and TNFA at points G-308A, G-238A in population of Bashkir RA patients and a control group to identify possible associations.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — это хроническое воспалительное заболевание суставов, которое считается аутоиммунным, то есть связанным с дисбалансом в иммунной системе [4]. РА демонстрирует высокие уровни воспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-6 и IL-1, связанных с эрозией кости и прогрессированием заболевания. NF- κ B, также является наиболее изученным патофизиологическим механизмом при РА, однако недавно открытый белок RANKL, также связанный с активацией NF- κ B и эрозией кости, стал предметом интереса для исследований в области лечения РА [1]. С открытием механизма RANKL/RANK/OPG, который может представлять более значимый подход к лечению РА, возобновился интерес к исследованиям потенциальных воздействий, влияющих на путь RANKL/RANK/OPG, а также на исходы заболевания.

При РА иммунные клетки, такие как макрофаги и Т-лимфоциты, активируются и начинают вырабатывать избыточное количество TNF α . Он в свою очередь, стимулирует остеокласты к разрушению суставов и кости, приводя к хроническому воспалению и дегенеративным изменениям [3]. OPG, белок гена TNFRSF11B, действует как конкурирующий рецептор для TNF α , связываясь с ним и предотвращая его взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток [2]. Таким образом, уровень OPG в организме может влиять на баланс между воспалительным действием TNF α и его ингибирующим эффектом на костную ткань. Нарушение этого баланса в пользу провоспалительных цитокинов ведет к хроническому воспалению и деструкции суставов, что является характерной чертой РА. Наиболее изученными полиморфизмами TNF α являются G-308A (продукция белка увеличивается) и G-238A (продукция белка уменьшается). В этот же момент полиморфизм гена TNFRSF11B в точке G1181C меняет свойства белка OPG, из-за чего его последующее соединение с RANKL снижается, нарушая баланс сигнального пути RANKL/RANK/OPG [5].

Исходя из вышесказанного, **цель** нашего исследования — оценить распределение частот сочетаний генотипов SNPs TNFRSF11B в точке G1181C и генотипов TNFA в точках G-238A и G-308A у больных РА в сравнении с контрольной группой.

Материалы и методы

Выборка больных РА башкирской популяции состояла из 49 человек. В качестве группы сравнения использовали коллекцию образцов ДНК 94 кадровых доноров стволовой клетки ГБУЗ «ЧОСПК», проживающих

в Челябинской области, сформированную случайным образом. Принадлежность к этнической группе определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения. Генотипирование полиморфного локуса проводили методом аллель-специфической ПЦР (реактивы ООО «НПФ Литех»). Для расчета достоверности различий аллелей и генотипов использовали: программу Past, критерий χ^2 , OR с расчетом 95 % ДИ, онлайн-приложения: Медицинская статистика [<https://medstatistic.ru>]. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

В исследуемых группах определены следующие комбинации генотипов TNFRSF11B в точке 1181G/C и TNFA в точке -308G/A (табл. 1).

Таблица 1

Сочетания генотипов TNFRSF11B в точке 1181G/C и TNFA в точке -308G/A

Сочетания генотипов TNFRSF11B и TNFA	Больные РА N = 49	Контрольная группа N = 94	χ^2 , p
1181C/C — -308A/A	0 %	0 %	$p > 0,05$
1181C/C — -308G/A	2 %	6,4 %	$p > 0,05$
1181C/C — -308G/G	18,4 %	14,9 %	$p > 0,05$
1181G/C — -308A/A	0 %	1 %	$p > 0,05$
1181G/C — -308G/A	20,5 %	12,8 %	$p > 0,05$
1181G/C — -308G/G	44,9 %	36,2 %	$p > 0,05$
1181G/G — -308A/A	0 %	0 %	$p > 0,05$
1181G/G — -308G/A	2 %	4,2 %	$p > 0,05$
1181G/G — -308G/G	12,2 %	24,5 %	$\chi^2=2,98$, $p=0,085$

Было установлено сочетание генотипов TNFRSF11B и TNFA **1181G/G — -308G/G** на уровне тенденции (12,2 % против 24,5 %, $\chi^2=2,98$, $p=0,085$), носители которого чаще обнаруживались среди контрольной выборки по сравнению с больными РА. При расширении выборки и достижении статистически значимых результатов данное сочетание может являться протекторным при развитии предрасположенности к РА.

При исследовании сочетаний генотипов TNFRSF11B в точке 1181G/C и TNFA в точке -238G/A были определены следующие комбинации (табл. 2).

Таблица 2

Сочетания генотипов TNFRSF11B в точке 1181G/C и TNFA в точке -238G/A

Сочетания генотипов TNFRSF11B и TNFA	Больные РА N=49	Контрольная группа N=75	χ^2 , p
1181C/C — -238A/A	0 %	0 %	$p > 0,05$
1181C/C — -238G/A	2 %	5,3 %	$p > 0,05$
1181C/C — -238G/G	18,5 %	14,7 %	$p > 0,05$
1181G/C — -238A/A	0 %	0 %	$p > 0,05$
1181G/C — -238G/A	14,3 %	5,3 %	$\chi^2=2,938$, $p=0,087$
1181G/C — -238G/G	51 %	49,3 %	$p > 0,05$
1181G/G — -238A/A	0 %	0 %	$p > 0,05$
1181G/G — -238G/A	2 %	6,7 %	$p > 0,05$
1181G/G — -238G/G	12,2 %	18,7 %	$p > 0,05$

Было обнаружено сочетание генотипов TNFRSF11B и TNFA **1181G/C — -238G/A** на уровне тенденции (14,3 % против 5,3 %, $\chi^2=2,938$, $p=0,087$), носители которого чаще обнаруживались среди больных РА по сравнению с контрольной выборкой. При расширении выборки и достижения статистически значимых результатов данную комбинацию генотипов, вероятно, можно будет рассматривать как предрасполагающую к развитию РА.

Выводы

Были установлены особенности частот сочетаний генотипов генов TNFRSF11B и TNFA 1181G/G — -308G/G и 1181G/C — -238G/A в группе больных ревматоидным артритом. В следующих исследованиях мы планируем

расширить диапазон выборки, а также провести анализ в популяции русских больных РА. Проведенное нами исследование является продолжением изучения комплексной оценки взаимодействия цитокинов и их рецепторов суперсемейства TNF α как иммуногенетического компонента РА.

Литература

1. Ilchovska DD, Barrow DM. An Overview of the NF- κ B mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF- κ B ligand RANKL and related nutritional interventions. *Autoimmun Rev.* 2021 Feb;20(2):102741. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102741. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33340772.
2. Nagi, Soher & Al-Namnam, Nisreen & Shaghayegh, Gohar. (2021). Osteoprotegerin (OPG) pathways in bone diseases and its application in therapeutic perspectives. *Biointerface Research in Applied Chemistry.* 10. 5193 — 5200. 10.33263/BRIAC102.193200.
3. Serio, Bruno & Paolino, Sabrina & Sulli, Alberto & Ferretti, Valentino & Cutolo, Maurizio. (2006). Bone metabolism changes during anti-TNF- α therapy in patients with active rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1069. 420-7. DOI:10.1196/annals.1351.040;
4. Насонов, Е. Л. Российские клинические рекомендации. Ревматология [Электронный ресурс] / Е. Л. Насонов — М.; ГЭОТАР-Медиа, 2017. 464 с. ISBN 978-5-9704-4261-6.
5. Чумачёва, Ю. В. Полиморфизм генов TNFRSF11B и TNFA и их возможные ассоциации с ревматоидным артритом // Наука будущего — наука молодых: VII Всероссийский молодежный форум. Сборник тезисов докладов участников, Новосибирск, 23 августа — 26 августа 2022 года.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-393

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МРНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА H1N1***EXPERIMENTAL MRNA VACCINE AGAINST H1N1 INFLUENZA VIRUS**

С. В. Шарабрин, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, С. И. Красникова, А. С. Гудымо, К. И. Иванова, В. Ю. Марченко, Т. Н. Ильичева, А. П. Рудомётов, А. А. Ильичёв, Л. И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

S. V. Sharabrin, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, D. N. Kisakov, L. A. Kisakova, S. I. Krasnikova, A. S. Gudymo, K. I. Ivanova, V. Yu. Marchenko, T. N. Ilyicheva, A. P. Rudometov, A. A. Ilyichev, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ sharabrin.sv@gmail.com

Аннотация

Работа посвящена разработке экспериментальной мРНК вакцины, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа H1N1 и содержащей последовательность β-глобина в качестве 5'- и 3'-нетранслируемых областей. Иммунизация мышей линии BALB/C вызывала индукцию специфических антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, формирует Т-клеточный иммунный ответ и обеспечивала 60 % защиту животных от летального заражения вирусом гриппа H1N1.

Abstract

The work is devoted to the development of an experimental mRNA vaccine encoding H1N1 influenza virus hemagglutinin and containing the β-globin sequence as 5'- and 3'-untranslated regions. Immunization of BALB/C mice caused the induction of specific antibodies with virus-neutralizing activity, forms a T-cell immune response, and provided 60 % protection of animals from lethal infection with the H1N1 influenza virus.

Одним из наиболее многообещающих подходов к созданию вакцин против вирусов с высокой вариабельностью является создание вакцин на основе матричной РНК. Ряд особенностей существенно отличает их от других вакцинных платформ. мРНК-вакцины способны активировать оба звена иммунитета, как клеточный, так и гуморальный. Кроме того, они неинфекционны, отличаются гибкостью, масштабируемостью, быстротой и недорогим производством.

Среди вирусных инфекций, вызываемых высоковариабельными вирусами и требующими создание высокоэффективной вакцины, нужно выделить респираторные заболевания, вызываемые вирусами гриппа. Сезонные вирусы гриппа А и В, вызывающие около 3–5 миллионов случаев заболевания в год и до 600 тыс. случаев смерти во всем мире. Постоянный антигенный дрейф циркулирующих вирусов гриппа приводит к тому, что сезонные вакцины против гриппа становятся неэффективными и возникает необходимость ежегодного перевыпуска таких вакцин. мРНК-вакцины в данном случае имеют преимущества перед стандартными технологиями получения гриппозных вакцин. Возможность быстро и легко заменять целевой ген в мРНК-вакцине, не меняя саму технологию производства, позволяет быстро реагировать на появление новых штаммов вируса.

Цель данной работы заключалась в разработке экспериментальной мРНК вакцины против вируса гриппа H1N1 и оценке её иммуногенных свойств.

Синтез мРНК, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа H1N1, проводили с ДНК-матрицы, несущей целевой ген под контролем промотора фага Т7. Для повышения эффективности трансляции белка и стабильности мРНК в матрицу были добавлены 5'- и 3'- UTR гена β-глобина человека, а за 3'-UTR был встроены поли(А)-хвост длиной 100 аденинов. Синтез проводили с использованием Т7-полимеразы (Биолабмикс, Новосибирск), уридин был заменен на метилпсевдуридин, а в качестве кэпа использовался AG-сар аналог (Биолабмикс, Новосибирск).

Для исследования иммуногенности мРНК-вакцины были использованы мыши линии Balb/c (самки) массой 16–18 г. Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности. Было сформировано 2 группы по 10 животных в каждой для оценки протективности и две группы из 5 животных для оценки Т-клеточного иммунного ответа. Иммунизацию мышей проводили в четырехглавую мышцу задней левой лапы

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© С. В. Шарабрин, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, С. И. Красникова, А. С. Гудымо, К. И. Иванова, В. Ю. Марченко, Т. Н. Ильичева, А. П. Рудомётов, А. А. Ильичёв, Л. И. Карпенко, 2023

дважды на 0 и 14 дни. Животным вводили внутримышечно 30 мкг мРНК в 50 мкл PBS с помощью струйной инъекции.

После двукратной иммунизации в сыворотках животных были идентифицированы специфические антитела к гемагглюнину и показано, что антитела обладают вируснейтрализующей активностью в тесте с живым вирусом. Тесты ELISPOT и ICS показали формирование Т-клеточного иммунного ответа.

Для оценки защитного действия разработанной мРНК-вакцины проводили интраназальное заражение иммунизированных мышей летальной дозой вируса гриппа A/California/04/09 (H1N1) MA8, в дозе 20 МЛД₅₀ в объеме 50 мкл. Мышей заражали через 21 день после начала эксперимента (на 8 день после 2-ой иммунизации). Было показано, что мРНК-вакцина вызывает статистически значимый защитный эффект от летальной дозы вируса A/California/4/2009(H1N1pdm09), выживаемость мышей экспериментальной группы составила 60 %.

Таким образом, в результате проделанной работы была получена экспериментальная мРНК вакцина, кодирующая белок гемагглюнина гриппа H1N1, и содержащая последовательности β -глобина в качестве 5'- и 3'-транслируемых областей. Показано, что иммунизация мышей линии BALB/C вызывает индукцию специфических антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, формирует Т-клеточный иммунный ответ и обеспечивает 60%-ю защиту животных от летального заражения вирусом гриппа H1N1.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-394

**ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЛЮЦИФЕРАЗЫ
ИЗ ДИНОФИТОВЫХ ВОДРОСЛЕЙ *PYROCYSTIS LUNULA* В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ*****HETEROLOGOUS EXPRESSION OF *PYROCYSTIS LUNULA* LUCIFERASE GENE IN PLANT CELLS**Е. С. Шахова, Н. М. Мышкина, Р. И. Загитова, А. А. Котлобай, В. В. Морозов,
А. В. Балакирева, И. В. Ямпольский, З. М. Осипова*Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*E. S. Shakhova, N. M. Myshkina, R. I. Zagitova, A. A. Kotlobay, V. V. Morozov,
A. V. Balakireva, I. V. Yampol'skij, Z. M. Osipova*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ ekashakhova31@gmail.com

Аннотация

Биолюминесценция динофлагеллят происходит при окислении молекулы люциферина, относящегося к классу тетрапирролов, который, вероятно, является продуктом катаболизма хлорофилла *a*. Мы показали функциональность гена люциферазы динофлагеллят *P. lunula* на транзientной и стабильной трансформации культуры клеток *N. tabacum* BY-2. Результаты далее будут использованы для изучения пути биосинтеза люциферина динофлагеллят.

Abstract

Bioluminescence of dinoflagellates is a result of oxidation of the luciferin, which belongs to the class of tetrapyrroles and is possibly a product of chlorophyll *a* catabolism. We have demonstrated the functionality of the dinoflagellate luciferase gene from *P. lunula* in the transient and stable transformation of *N. tabacum* BY-2 cell culture. The results will be used further for the investigation of the luciferin biosynthetic pathway.

Использование существующих биолюминесцентных систем при разработке новых аналитических методов для биоимиджинга ограничено необходимостью экзогенного добавления низкомолекулярного субстрата — люциферина. Изучение путей биосинтеза люциферина позволяет определить гены, кодирующие ферменты, катализирующие полную последовательность превращений, приводящих к биолюминесценции. Перенос этих генных кассет в гетерологические организмы может исключить необходимость добавления люциферина извне при разработке автономных биоимиджинговых методов.

Люциферин динофитовых водорослей представляет собой тетрапиррол, структурно родственной хлорофиллу *a*, и, вероятно, образуется в результате его дегградации [1]. Расшифровка пути биосинтеза люциферина динофлагеллят теоретически позволила бы перенести данную биолюминесцентную систему в организмы, экспрессирующие гены биосинтеза хлорофилла *a*, для формирования у них автономной люминесценции. Чтобы проверить эту гипотезу, мы создали генетическую конструкцию, кодирующую каталитический домен 3 люциферазы *Pyrocystis lunula* [2] под контролем сильного конститутивного промотора 35s, которую в дальнейшем трансформировали в агробактерии. Далее мы провели транзientную гетерологическую экспрессию гена люциферазы путем инфильтрации BY-2 клеток агробактериями, а также создали линию BY-2, стабильно экспрессирующую данный ген. Функциональность люциферазы в растительных клетках была показана как для транзientной, так и для стабильной трансформаций. Дальнейшая оптимизация этой системы позволит разработать тест-систему для поиска генов, участвующих в биосинтезе люциферина динофлагеллят.

Литература

1. Topalov G., Kishi Y. Chlorophyll catabolism leading to the skeleton of dinoflagellate and krill luciferins: hypothesis and model studies // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, V. 40, No. 20. P. 3892-3894.
2. Fajardo C., Donato M. D., Rodulfo H., Martinez-Rodriguez G., Costas B, Mancera J. M., Fernandez-Acero F. J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1784

* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых кандидатов наук МК-4055.2022.1.4.

© Е. С. Шахова, Н. М. Мышкина, Р. И. Загитова, А. А. Котлобай, В. В. Морозов, А. В. Балакирева, И. В. Ямпольский, З. М. Осипова, 2023

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-395

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ БЕЛКОВ ЭКЗОСОМ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, И ПОИСК БЕЛКОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ «ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ»^{*}**CHARACTERIZATION OF EXOSOMAL PROTEINS DERIVED FROM DIFFERENT BREAST CELL LINES AND SEARCH FOR CANDIDATE PROTEINS FOR LIQUID BIOPSY**А. А. Шефер^{1,2}, Л. В. Яньшолё³, А. Е. Григорьева¹, С. Н. Тамкович^{1,2}¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*²*Новосибирский государственный университет*³*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*A. A. Shefer^{1,2}, L. V. Yanshole³, A. E. Grigorieva¹, S. N. Tamkovich^{1,2}¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*²*Novosibirsk State University*³*International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk*

✉ a.shefer@g.nsu.ru

Аннотация

Экзосомы являются внеклеточными везикулами, которые секретируются клетками организма и присутствуют в различных биологических жидкостях. Они обеспечивают передачу сигнала между клетками как при нормальных биологических процессах, так и при различных патологических состояниях, включая рак молочной железы. В данном исследовании было проведено выделение и характеристика экзосом, секретируемых различными клеточными линиями рака молочной железы и идентификация белков в их составе.

Abstract

Exosomes are extracellular vesicles secreted by the cells of the organism and are present in various biological fluids. They provide signal transduction between cells both in normal biological processes and in various pathological conditions including breast cancer. In this study, we isolated and characterized exosomes secreted by different breast cancer cell lines and identified proteins in their composition.

Для идентификации белков, вовлеченных в опухолевую диссеминацию экзосомы из кондиционной среды клеточных линий HBL-100 и MCF-10A (псевдо-нормальные эпителиоциты молочной железы), MCF-7, T-47D и ZR-75-1 (люминальный А подтип карциномы молочной железы), BT-474 (люминальный В (HER2+) подтип карциномы молочной железы), SK-BR-3 (HER2+ подтип карциномы молочной железы), BT-549, MDA-MB-231, HCC-1937 и MDA-MB-468 (трижды негативный подтип карциномы молочной железы) в препаративных количествах выделены с помощью комбинации методов ультрафильтрации и ультрацентрифугирования.

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицировано 559 белков в составе экзосом из 11 клеточных линий, из них 9 белков являлись универсальными для экзосом всех клеточных линий, 6 — общих для линий псевдо-нормальных эпителиоцитов HBL-100 и MCF-10A и 16 характерных только для линий карциномы молочной железы. Выявлены значительные изменения в функциональном составе экзосомальных белков, в частности, в составе экзосом опухолевых клеток значительно повышается содержание белков, имеющих ДНК-связывающую функцию и вовлеченных в метаболизм нуклеиновых кислот, при этом снижается содержание белков, вовлеченных в регуляцию иммунного ответа. Методом сравнительного протеомного анализа выявлены 16 потенциальных белков-маркеров для выявления рака молочной железы методом «жидкостной биопсии»; среди этих белков обнаружено 8 характерных для люминальных подтипов (A0A1B0GVZ2, Q5TZK3, Q9BUV0, P50914, Q8TAT2, P39905, Q75MW2, E0CX11), 3 — для HER2+ подтипа (P46779, Q6UWS5, Q8WXA9), и 3 — для трижды негативного подтипа рака молочной железы (Q9BSF0, Q6ZS46, Q5T5Y3).

Идентификация белков в экзосомах различных клеточных линий рака молочной железы позволила выявить значительные различия в составе экзосом псевдо-нормальных клеток, и клеточных линий РМЖ различных подтипов. Выявлены перспективные протеомные маркеры для диагностики люминальных, HER2+ и трижды негативного подтипов РМЖ методом «жидкостной биопсии»

^{*} Исследование выполнено при поддержке гранта ИХБФМ СО РАН № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-396

**РАЗРАБОТКА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ НАНОТЕЛ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19*****DEVELOPMENT OF NEUTRALIZING RECOMBINANT NANOBODIES
FOR TREATMENT AND PREVENTION OF COVID-19**

В. А. Шокина, С. А. Доронин, А. В. Кудрявцев

Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины, Москва

V.A. Shokina, S.A. Doronin, A.V. Kudryavtsev

Scientific Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

✉ v.shokina@systbiomed.ru

Аннотация

Быстрая изменчивостью коронавируса вынуждает использовать альтернативные стратегии защиты человека от COVID-19. В связи с чем нами было получено нанотело, которое блокирует связывание RBD-домена S-белка вируса SARS-CoV-2 с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2).

Abstract

The rapid variability of coronavirus forces the use of alternative strategies to protect humans from COVID-19. Therefore, we have developed a nanobody that blocks the binding of RBD domain of the S-protein of SARS-CoV-2 virus to the angiotensin-converting enzyme type 2 (ACE2).

Стремительная изменчивость коронавируса SARS-CoV-2 наделяет его способностью уклоняться от специфичных для вируса терапевтических или собственных антител [1]. Например, сейчас, субвариант омикрона «кракен» имеет мутацию в S-белке, увеличивающую аффинность связывания с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2).

Было показано, что сайт связывания ACE2 с RBD не перекрывается с его каталитическим сайтом для взаимодействия с ангиотензинпревращающим ферментом-2, поэтому антитела, взаимодействующие с сайтом связывания рецептора ACE2 и RBD могут блокировать проникновение всех ACE2-зависимых коронавирусов (SARS-CoV-2, SARS-CoV, HCoV-NL63 и др.) при сохранении физиологической активности ACE2 [2]. Такие антитела

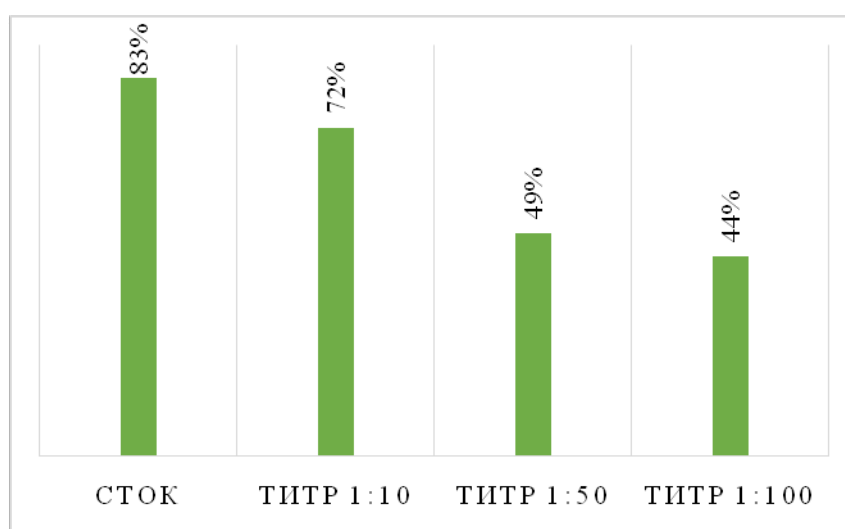


Рис. 1. Процентный индекс нейтрализации нанотел после предварительной совместной инкубации с RBD-доменом S-белка вируса SARS-CoV-2. Сток — стоковая концентрация антител (300 мкг/мл)

теоретически могут быть использованы для борьбы с текущими и будущими вспышками коронавируса, а также быть устойчивыми к вирусным мутациям, так как направлены не на постоянно изменяющийся на S-белок.

Нами было получено рекомбинантное акулье нанотело к рецептору ACE-2. Нанотела были выбраны нами в связи с их высокой стабильностью, увеличенной степенью проникновения в ткани по сравнению с классическими антителами и возможностью наработки антител в клетках *Escherichia coli*. Эффективность нейтрализующей способности антител к вирусу SARS-CoV-2 оценивалась с помощью иммуноферментного анализа. Для этого наши рекомбинантные нанотела предварительно инкубировали с антигеном в двух вариантах. В первом варианте мы предварительно подвергли совместной инкубации нанотела с RBD-доменом S-белка вируса SARS-CoV-2, а затем с рецептором ACE2. Во втором варианте мы предварительно инкубировали нанотела с ACE2, а затем с вирусным спайк-белком.

По результатам ИФА процентный индекс нейтрализации нанотел в концентрации 3мкг (титр 1:10) составил 72 % в случае с прединкубацией нанотел с RBD-доменом S-белка вируса SARS-CoV-2 (рис. 1) и 76 % в случае предварительной совместной инкубацией с рецептором ACE2 (рис. 2). Стоковая концентрация нанотела равная 300 мкг/мл показала высокую нейтрализующую способность в обоих вариантах предварительной совместной инкубации.

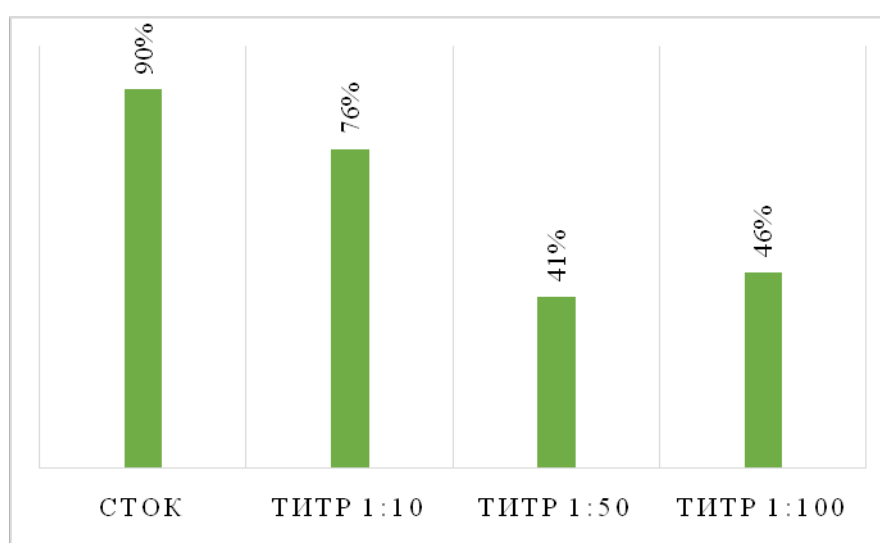


Рис. 2. Процентный индекс нейтрализации нанотел после предварительной совместной инкубации с рецептором ACE2. Сток — стоковая концентрация антител (300 мкг/мл)

Полученные результаты открывают перспективу использования данных нанотел на животных моделях для оценки эффективности *in vivo*.

Литература

1. Chaouat A. E., Brizic I., Brlc P. K. et al. Anti-human ACE2 antibody neutralizes and inhibits virus production of SARS-CoV-2 variants of concern // *iScience*. 2022. V. 25.
2. Zhang F., Jenkins J., Carvalho V. H., Nakandakari-Higa S., Chen T. et al. Pan-sarbecovirus prophylaxis with human anti-ACE2 monoclonal antibodies // *Nature Microbiology*. 2023. V. 8. P. 1051–1063.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-397

МИКРОРНК ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МОЧИ — ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***MIRNAS OF URINE EXTRACELLULAR VESICLES — POTENTIAL MARKERS OF THE EFFECTIVENESS OF PROSTATE CANCER THERAPY**

Е. В. Шутко¹, Г. Саллум¹, О. Е. Брызгунова¹, Е. А. Мурина¹,
И. А. Остальцев², С. В. Пак², П. П. Лактионов^{1,2}, М. Ю. Коношенко¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск

E. V. Shutko¹, G. Salloum¹, O. E. Bryzgunova¹, E. A. Murina¹,
I. A. Ostal'cev², S. V. Pak², P. P. Laktionov^{1,2}, M. Yu. Konoshenko¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

²Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk

✉ katshutko@gmail.com

Аннотация

В процессе терапии рака предстательной железы (РПЖ) наблюдается изменение экспрессии микроРНК, вовлеченных в развитие РПЖ. Экспрессия микроРНК внеклеточных везикул мочи является перспективным маркером эффективности лечения. С помощью анализа экспрессии 14-ти микроРНК ВВ мочи пациентов с РПЖ до, а также через 3, 6 и 12 месяцев после радикальной простатэктомии (РПЭ) и лучевой терапии (ЛТ), выявлены пары микроРНК — потенциальные маркеры эффективности РПЭ и ЛТ.

Abstract

During the therapy of prostate cancer (PCa), there is a change in the expression of miRNAs involved in the development of PCa. miRNA expression of urine extracellular vesicles is a promising marker of the therapy effectiveness. miRNA ratios — potential markers of the effectiveness of radical prostatectomy (RP) and radiation therapy (RT) — were identified by analyzing the expression of 14 miRNAs in the urine of PCa patients before, as well as 3, 6 and 12 months after RP and RT.

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) в настоящее время делит первое место по заболеваемости с раком легких и занимает пятое место по смертности от онкологических заболеваний среди мужчин во всем мире. Наиболее распространенными методами лечения РПЖ являются хирургическое вмешательство — радикальная простатэктомия (РПЭ) — и лучевая терапия (ЛТ). Тем не менее, после лечения примерно в трети случаев (20-40 % после РПЭ и 31-46 % после ЛТ) в течение 5 лет наблюдается развитие рецидива. По этой причине необходимым становится поиск маркеров эффективности терапии и разработка прогностических методов. Оценка эффективности терапии РПЖ критически важна для качественного лечения пациентов. Одним из наиболее перспективных источников прогностических маркеров являются внеклеточные везикулы (ВВ) мочи, содержащие микроРНК. Аберрантная экспрессия микроРНК наблюдается не только при различных заболеваниях, в том числе онкологической природы, но и в процессе терапии. Исходя из этого, оценка уровня экспрессии микроРНК может быть использована в диагностических и прогностических целях.

Целью исследования является анализ динамики экспрессии микроРНК ВВ мочи у больных РПЖ после РПЭ и ЛТ с точки зрения поиска перспективных прогностических маркеров.

Материалы и методы

Образцы мочи 18 здоровых доноров (ЗД), 22 больных РПЖ до и после РПЭ (через 3, 6 и 1,2 месяцев) и 10 больных РПЖ до и после ЛТ (через 3, 6 и 1,2 месяцев) получены из ОПК и радиологического отделения Национального медицинского исследовательского центра им. академика Е. Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия). ВВ были выделены из образцов мочи методом агрегации-преципитации с использованием полиэтиленгликоля

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-10026, <https://rscf.ru/project/23-25-10026/> в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта 0000005406995998235120582/ № p-45.

© Е. В. Шутко, Г. Саллум, О. Е. Брызгунова, Е. А. Мурина, И. А. Остальцев, С. В. Пак, П. П. Лактионов, М. Ю. Коношенко, 2023

и декстрана голубого. Из полученной фракции ВВ мочи были выделены микроРНК. С помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени были получены данные о пороговых циклах детекции каждой из 14 (miR-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -1,25b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) выбранных на основе литературных данных и биоинформатического анализа микроРНК в образцах доноров. Статистическая обработка данных была выполнена в программе MedCalc Statistical Software. Работа выполнена в ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Результаты

С использованием дисперсионного анализа повторных измерений были выявлены 22 и 40 пар (метод парной нормировки) микроРНК, достоверно изменивших экспрессию после лечения — РПЭ и ЛТ соответственно. Проанализировав динамику относительной экспрессии микроРНК, были выявлены ее различные паттерны. Пары микроРНК, изменяющие экспрессию после РПЭ и ЛТ, можно разделить на три группы с одинаковыми для обоих видов терапии паттернами динамики экспрессии:

1. Пары, уровень экспрессии которых достоверно различался между ЗД и больными РПЖ до РПЭ или ЛТ и достоверно изменялся у больных через 12 месяцев после РПЭ или ЛТ по направлению к уровню ЗД или достигал такового (10 и 27 пар для РПЭ и ЛТ соответственно);

2. Пары, уровень экспрессии которых достоверно различался между ЗД и больными РПЖ до РПЭ или ЛТ и достоверно изменялся у больных через 12 месяцев после РПЭ или ЛТ по направлению, противоположному уровню ЗД (1 и 5 пар);

3. Пары, достоверно не изменявшие свою экспрессию через 12 месяцев после терапии согласно критериям, описанным выше (11 и 8 пар).

Кроме того, было выявлено 20 пар микроРНК, на основе значимых различий экспрессии которых пациентов можно разделить на 2 или 3 достоверно различные подгруппы через 3 или 6 месяцев после РПЭ, а также 21 пара микроРНК, по уровню экспрессии которых через 1 год после ЛТ 2 пациента с признаками биохимического рецидива значительно отличались от остальных доноров.

Наиболее значимыми критериями для разделения пар микроРНК на группы были признаны направление изменения экспрессии после терапии и достоверные различия между уровнями экспрессии микроРНК до лечения и через год после. Таким образом, основной интерес с точки зрения оценки эффективности терапии представляют собой 10 и 27 пар микроРНК, относительная экспрессия которых после РПЭ и ЛТ соответственно приблизились к таковой у здоровых доноров, в том числе 5 пар, обладающих универсальной маркерной функцией, то есть пары, в перспективе подходящие для оценки эффективности и РПЭ, и ЛТ: miR-31/375, miR-30e/92a, miR-30e/205, miR-125b/660, miR-200b/375.

Выводы

Анализ динамики относительной экспрессии микроРНК после РПЭ и ЛТ выявил 10 и 27 пар микроРНК — потенциальных маркеров эффективности РПЭ и ЛТ соответственно. Оценка эффективности терапии РПЖ путем анализа относительной экспрессии выявленных микроРНК, достоверно изменяющих свою экспрессию после радикального лечения, представляет собой потенциально ценный прогностический инструмент.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-398

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ДНК-ВАКЦИНЫ pVAXrBD НА МОДЕЛИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C, ИММУНИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОМ СТРУЙНОЙ ИНЖЕКЦИИ*

EVALUATION OF IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF pVAXrBD DNA VACCINE IN BALB/C MICE IMMUNIZED BY JET INJECTION METHOD

В. А. Яковлев, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, Е. В. Тигеева, М. Б. Боргоякова, А. В. Зайковская, А. В. Шиповалов, Г. А. Кудров, О. В. Пьянков, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

V.A. Yakovlev, D. N. Kisakov, L. A. Kisakova, E. V. Tigeeva, M. B. Borgoyakova, A. V. Zaikovskaya, A. V. Shipovalov, G. A. Kudrov, O. V. Pyankov, A. P. Rudometov, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ yva20009@mail.ru

Аннотация

В результате проделанных работ установлено, что иммунизация экспериментальной ДНК-вакциной pVAXrbd с применением струйной инъекции значительно усиливает иммунный ответ мышей BALB/c. При этом наблюдается тенденция к увеличению титров специфических антител при повышении дозы вакцины. Исследование протективности показало, что вакцина оказывает дозозависимый защитный эффект, достоверно снижая вирусную нагрузку в тканях легких в сравнении с контролем.

Abstract

As a result of this work, it was found that immunization with the experimental DNA vaccine pVAXrbd using jet injection significantly enhances the immune response of BALB/c mice. There was a tendency for specific antibody titers to increase with increasing vaccine dose. Challenge study showed that the vaccine has a dose-dependent protective effect, significantly reducing the viral load in lung tissues compared to the control.

В последние годы большое развитие в направлении создания вакцин получили ДНК-вакцины. По сравнению с традиционными подходами к созданию вакцин, они обладают несколькими важными преимуществами: ДНК-вакцины способны индуцировать как гуморальное, так и клеточное звено иммунной системы, характеризуются низкой реактогенностью, имеют относительно высокий профиль безопасности, а также легко адаптируются для новых антигенов. Основным препятствием, с которым сталкиваются исследователи при разработке ДНК-вакцин, является низкая иммуногенность при введении «голой» ДНК. Для решения данной проблемы совершенствуются различные способы доставки вакцины в клетки. Одним из наиболее перспективных методов доставки является безыгольная струйная инъекция. Принцип работы струйной инъекции позволяет регулировать глубину введения вакцины, благодаря чему можно эффективно доставить препарат как в мышечную ткань, так и в эпидермис и дерму, содержащие большое количество АПК. Кроме того, применение струйной инъекции связано с увеличением площади распространения препарата в тканях. Все это ведет к значительному увеличению эффективности доставки ДНК-вакцин в клетки и последующему росту иммуногенности профилактических препаратов.

Ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» была получена ДНК-вакцинная конструкция — pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2.

Цель данного исследования — оценить влияние струйной инъекции на иммуногенные и протективные свойства ДНК-вакцины pVAXrbd, а также исследовать дозозависимый эффект данной ДНК-вакцины.

В работе использовали мышей линии Balb/c весом 20–23 г. Для введения экспериментальной ДНК-вакцины использовали опытный образец безыгольного струйного инжектора со следующими характеристиками: скорость потока 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 с. Для снижения болевого синдрома применялся ингаляционный наркоз животных с применением 2,5 % изофлурана. Вакцину вводили двукратно с интервалом 3 недели в трех дозах — 50, 100 и 200 мкг в 50 мкл физ. раствора, с помощью струйного инжектора. Контролем служила группа интактных животных. Через 10 дней после второй иммунизации у животных отбира-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

ли сыворотки крови и проводили исследование протективности ДНК-вакцины.

Для оценки индукции иммунного ответа после введения pVAXrbd с помощью струйной инъекции выявляли уровни RBD-специфических антител с помощью ИФА. Связывание IgG с рекомбинантным белком RBD увеличивалось дозозависимым образом, достигая среднего титра 1:83700, 1:539040 и 1:876450 для групп, получавших 50, 100 и 200 мкг плазмидной ДНК соответственно.

Аналогичным образом наблюдалось дозозависимое увеличение нейтрализующей активности в отношении живого вируса SARS-CoV-2. Животные, вакцинированные 50 мкг pVAXrbd, имели реципрокный средний титр ID_{50} , равный 43, тогда как сыворотки групп, получавших 100 и 200 мкг, имели в 11- и 16- раз более высокий титр вируснейтрализации (495 и 704, соответственно).

Для оценки протективной эффективности вакцины pVAXrbd животные подвергались интраназальному введению 50 ID_{50} (штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (Гамма-вариант SARS-CoV-2)). Конечной точкой был четвертый день после заражения. В группах, иммунизированных различными дозами, выявлено, что увеличение дозы показало тенденцию к увеличению протективности ($p > 0,05$, тест Краскела-Уоллиса), максимальная степень которой была отмечена в группе иммунизированных 100 мкг pVAXrbd. В этой группе отмечалось снижение вирусной нагрузки в тканях легких на $1,47 \log_{10}$ (1,39-1,54) относительно интактного контроля, что продемонстрировало наибольший уровень достоверности различий ($p = 0,006$, тест Данна). Повышение дозы до 200 мкг не показало увеличения эффективности.

В результате исследования было показано, что иммунизация мышей BALB/c ДНК-вакциной pVAXrbd с применением метода струйной инъекции значительно усиливает гуморальный иммунный ответ, причем при повышении дозы наблюдается тенденция к увеличению титров специфических антител, в том числе и вируснейтрализующих. Исследование протективности в отношении Гамма-варианта SARS-CoV-2 показало, что вакцина оказывает протективный эффект при введении в различных дозах, достоверно снижая вирусную нагрузку в тканях легких в сравнении с контролем. Наибольшее снижение вирусной нагрузки ($\sim 1,47 \log_{10}$) продемонстрировано в группе мышей вакцинированных дозой 100 мкг pVAXrbd.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1526-1-399

СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА СО СНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СУБЪЕДИНИЦ KU-АНТИГЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9***CREATION OF HUMAN CELL LINES WITH A REDUCED CONTENT OF KU ANTIGEN SUBUNITS USING THE CRISPR/CAS9 SYSTEM**А. А. Ямских¹, Е. С. Ильина¹, Н. С. Дырхеева¹, С. П. Медведев²,
А. А. Малахова², С. М. Закиян², С. Н. Ходырева¹, О. И. Лаврик¹¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск²Институт цитологии и генетики СО РАН, НовосибирскA. A. Yamskikh¹, E. S. Ilina¹, N. S. Dyrkheeva¹, S. P. Medvedev²,
A. A. Malakhova², S. M. Zakian², S. N. Khodyreva¹, O. I. Lavrik¹¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk²Institute of Cytology and Genetic SB RAS, Novosibirsk

✉ a.yamskikh@g.nsu.ru

Аннотация

В данной работе были получены клоны на основе клеточных линий HEK293A и HEK293FT со сниженным содержанием белков Ku70 или Ku80 с использованием системы CRISPR/Cas9. Снижение количества целевых белков было подтверждено вестерн-блот анализом и методом аффинной модификации химически активными ДНК.

Abstract

In this work, using the CRISPR/Cas9 system, we obtained clones of HEK293A and HEK293FT cell lines with a reduced content of Ku70 or Ku80 proteins. The decrease in the target proteins amount was confirmed by Western blot analysis and affinity modification with chemically active DNA.

Онкологические заболевания являются одной из наиболее тяжелых заболеваний человека. Один из активно используемых методов противоопухолевой терапии основан на повреждении геномной ДНК раковых клеток (радиотерапия и химиотерапия). Системы репарации ДНК, удаляя повреждения, противостоят цитотоксическому действию ДНК-повреждающих агентов. В последние десятилетия активно проводится поиск путей повышения эффективности данного типа терапии за счет направленного воздействия на репарацию ДНК.

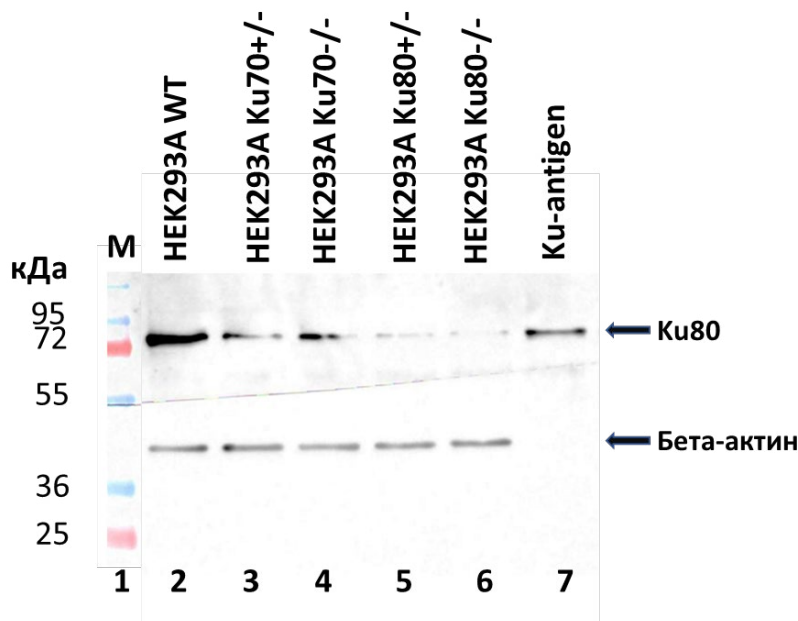
Один из перспективных подходов — воздействие на репарацию ДНК, в частности на удаление двухцепочечных разрывов (ДР) ДНК, являющихся наиболее цитотоксичными. Ku-антиген, гетеродимер, состоящий из двух субъединиц с молекулярными массами 69,9 кДа (Ku70) и 82,7 кДа (Ku80), является ключевым белком репарации ДР ДНК путем негомологичного соединения концов [1]. Эффективно связываясь с ДР, он инициирует репарацию. В связи с этим, перспективным направлением для разработки сопровождающей терапии к ДНК-повреждающим агентам является применение коротких ДНК-дуплексов, которые, имитируя ДР клеточной ДНК, ингибируют за счет конкуренции взаимодействие Ku-антигена с поврежденной ДНК. Предполагается, что введение таких ДНК в опухолевые клетки дезорганизует регуляцию репарации, что повысит их чувствительность к генотоксическим воздействиям, и позволит применять более низкие дозы ДНК-повреждающих агентов для уменьшения побочных эффектов. Удобной моделью для изучения указанных воздействий являются клетки со сниженным количеством Ku-антигена.

При создании целевых клеточных линий были подобраны протоспейсеры, направленные на формирование делеций в первых белок-кодирующих экзонах (экзон 1 в случае Ku70 и экзон 3 в случае Ku80). Содержание целевых белков оценивали вестерн-блот анализом. Количество функционально активных субъединиц Ku-антигена определяли с использованием химически активных ДНК.

В результате нашей работы получены клоны на основе клеточных линий HEK293A и HEK293FT со сниженным содержанием белков Ku70 или Ku80 с использованием системы CRISPR/Cas9. Анализ методом ПЦР подтвердил наличие CRISPR/Cas9-индуцированных делеций (далее — делеций) в генах, кодирующих целевые бел-

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-14-00204.

ки. Для клонов линий НЕК293А и НЕК293FT данные вестерн-блот анализа подтвердили снижение содержания Ку70 или Ку80 полипептидов. Кроме того, в клетках, полученных из линии НЕК293А, наблюдается сопутствующее снижение содержания второй субъединицы при уменьшении количества одной из субъединиц (см. рисунок), что согласуется с литературными данными о взаимной защите от протеолиза субъединицы-партнера в составе гетеродимера Ку70/Ку80 [2,3].



Вестерн-блот анализ экстрактов клеток НЕК293А с делециями в генах субъединиц Ку-антигена. НЕК293А Ku70^{-/-}, НЕК293А Ku80^{-/-} — клоны, содержащие только ПЦР-продукт, характерный для делеции в гене, кодирующем белок Ку70 или Ку80 соответственно. НЕК293А Ku70^{+/-}, НЕК293А Ku80^{+/-} — клоны, содержащие ПЦР-продукты, характерные для генов дикого типа и для делеций. НЕК293А WT — клетки дикого типа

Ранее было показано, что Ку-антиген обладает 5'-дезоксирибозофосфат-лиазной (5'-dRP-лиазной) активностью, удаляя 5'-dRP-группы возле ДР ДНК [4]. В процессе катализа происходит формирование временного ковалентного комплекса между белком и ДНК (через образование основания Шиффа). Анализ таких комплексов позволяет оценивать количество функционально активного Ку-антигена в экстрактах клеток. С использованием ДНК-дуплексов, содержащих 5'-dRP-остатки, продемонстрировано снижение эффективности модификации Ку-антигена в экстрактах полученных клеток в сравнении с экстрактами родительских клеток.

Литература

1. Zahid S. et al. The Multifaceted Roles of Ku70/80 // International Journal of Molecular Sciences. 2021; V. 22, № 8.
2. Gu Y. et al. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice // Immunity. 1997. V. 7, № 5. P. 653-665.
3. Errami A. et al. Ku86 defines the genetic defect and restores X-ray resistance and V(D)J recombination to complementation group 5 hamster cell mutants // Mol Cell Biol. 1996. V. 16, № 4. P. 1519-1526.
4. Roberts S.A. et al. Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends // Nature. 2010. V. 464. P. 1214-1217.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Ace V.D.	524	Kabwe E.	82	Saeidi A.	543
Adelyanov A. M.	295	Kalinina T. S.	527	Sahin S.	82
Afonnikov D. A.	3	Karabelsky A. V.	428	Salakhutdinov N. F.	541
Akhmetova E. A.	526	Kayushin A. L.	83	Salimova A. A.	86
Alahmari M.	85	Khaiboullina S. F.	82	Salomatina O. V.	537, 541
Al Allaf L.	426	Khomutov G. B.	295	Sapozhnikova E. N.	88
Aleksakhina I. A.	83	Kipen V. N.	7-9, 547, 549	Serba E. M.	92
Alekseeva L. A.	90	Koksharov Y. A.	295	Sergeeva O. V.	526
Andreeva N. Y.	82	Kolpashchikov D. M.	86, 524, 529, 531, 533, 535, 539	Sheyko R. I.	547, 549
Arnautova A. O.	83	Komissarov A. B.	531	Shoeva O. Y.	11
Ateiah M.	529	Kononchuk V. V.	527	Singatulina A. S.	545
Bardasheva A.	429	Konstantinova I. D.	83, 89	Smirnov V. V.	533
Berezovskaya M. Y.	84	Kozlova Yu.	429	Smirnova O. S.	89
Biriukova O. D.	527	Kukoeva T. V.	11	Snytkov E. V.	7-9, 547, 549
Bobkov G. A.	84	Lavrik O. I.	545	Sokolova E. N.	92
Bocharnikova M. E.	3	Markov A. V.	90, 537, 541	Sounbuli K.	90
Borodko D. D.	4	Martynova E. V.	82	Spiridonov V. V.	295
Brovin A. N.	428	Mashkovtseva E. V.	296	Sukhanova M. V.	545
Burskaya V. O.	5	Mezhenskaya D. A.	431	Sukhorukov V. N.	4
Bushaev A. A.	529	Mikhailova A. G.	5	Taranov I. V.	295
Chechushkov A.	426	Mikhailova M. E.	547, 549	Tikunov A.	429
Chesnokova O. R.	527	Minskaia E. S.	428	Tikunova N.	426, 429
Chubarov A. S.	297	Mironova N. L.	90	Toropova A. V.	539
Chuzhikov V. V.	527	Misnik E. V.	535	Tumaev A. V.	428
Davidyuk Y. N.	82	Mitin D. E.	297	Ushakova T.	426, 429
Dedovskaya A. A.	86	Molobekova C. A.	11	Validov S. Z.	82
Drozd V. D.	86	Moralev A. D.	537	Vidler A. D.	91
Efimenko B. E.	5, 6	Morozova V.	426, 429	Yaroslavov A. A.	295
Egorov A. D.	428	Mosentsova K. I.	539	Yuraskina T. V.	92
Eldeeb A. A.	86, 524, 531, 533, 535, 539	Nartsissov Y. R.	296	Zabrodskaya A. Ya.	431
Fedotova E. V.	293	Nikiforov N. N.	4	Zalomova L. V.	298
Fesenko Jr. E. E.	298	Nour M.	539	Zatsepin T. S.	526
Fursova N. A.	92	Odarenko K. V.	541	Zenkova M. A.	537, 541
Golovina L. A.	531	Omelchenko A. V.	4	Zhirnova V. A.	82
Gorbunov N. P.	431	Orlov M.	85	Zhuravleva S. V.	428
Goroh A. D.	293	Paston S. V.	293	Абашкин В. М.	300
Grigoryan I. V.	295	Patra C.	524	Абдулкадиева М. А.	367
Gunbin K. V.	5, 6	Polyakov D. S.	431	Абдулкадиева М. М.	302
Gurtsieva D. T.	428	Popadin K. Y.	5, 6	Абдуллин Т. И.	195
Gusarov Y. S.	5	Potapenkov K. V.	295	Абдуллоев Ф.	628
Humam A.	85	Potudanskaya M. O.	84	Абдулхаков С. Р.	652, 672
Hussein Z.	533, 531	Rak A. Ya.	431	Абдурахманова М. М.	550, 676
Iliushchenko D. V.	5, 6	Rubel M. S.	84, 529	Аветисян Е. А.	387
Isakova-Sivak I. N.	431	Rudenko L. G.	431	Агалакова Н. И.	710
Ivontsin L. A.	296	Rybalko D. S.	86	Аганов А. В.	361
Jdeed G.	429	Rybkina I.	85	Агапов М. А.	61, 556
				Агладзе К. И.	343, 407, 419

- Аглетдинов М. Р.447
 Аглетдинов Э. Ф.462
 Адонина С. Н.730
 Адюкина П. И.304
 Аззаг К.400
 Азоян Д. Т.95
 Аитова А. А.419
 Акахори Я.49, 554
 Акимкин В. Г.515
 Акино А. Д.138
 Аксенов В. В.134
 Акулиничев С. В.317
 Алексеев В. А.247
 Алексеева Л. А.552, 750
 Алексеева С. С.558
 Алексеенко И. В.659
 Алешина Ю. А.433
 Алрхмун С.12, 49, 51, 554
 Алсаллум А.49, 554
 Алхиреенко Д. А.217
 Амстиславский С. Я.379
 Ананьев Е. А.661
 Анисимова К. А.616
 Аноятбекова А. М.485
 Антипина М. И.556
 Антосюк О. Н.271
 Апанасевич М. В.558
 Аралов А. В.393
 Арефьева А. Б.658
 Аржанов Н. Е.383
 Аржанова Е. Л.560
 Арзуманян Г. М.421
 Арзыматов К.60
 Арляпов В. А.149
 Арсениев А. Н.709
 Артемов Г. Н.558
 Арынбек Е.421
 Асанбаева Н. Б.306
 Асатурова А. М.118
 Астахова Е. А.435
 Астрелина П. С.96
 Афанасьев С. А.734
 Афошин А. С.668
 Ахмадуллина Ф. Ю.205
 Бабаев А. А.694
 Бабаева Г.481
 Бабич О. О.97
 Бабкина И. Б.191, 227
 Бабошко Д. А.562
 Бабышкина Н. Н.620
 Багдигян С.400
 Багиров Р. Т.-о.191, 227
 Багров Д. В.309, 391
 Багрянская Е. Г.306, 377
 Базовкина Д. В.730
 Байдакова Г. В.573
 Байков И. К.682
 Баклашев В. П.405
 Бакшеева В. Е.583
 Балабова Д. В.99, 185
 Балакирева А. В.774
 Баландов С. Г.616
 Балахонова Е. А.680
 Балобанов В. А.756
 Балькова А. Н.564
 Балясин М. В.605
 Бараблина Ю. Е.20
 Баранов К. О.233, 435
 Баранова О. А.287
 Баранова С. В.198
 Барановская Е. Е.566
 Барановский А. Г.581
 Бардашева А. В.603
 Бардина М. В.212
 Барышникова В.437
 Багицев О. В.315
 Багтулина Н. В.686
 Багырова З. К.696, 761
 Багюченко А. В.439
 Бауэр И. А.568
 Бахно И. А.570
 Бачкова И. К.571
 Башарова К. С.573, 575
 Баяндин Р. Б.155
 Бедарева Е. В.505
 Безрукова А. И.573, 575
 Безязыкова М. В.262
 Белавин П. А.266
 Белаш Е. А.99
 Белая Т. Д.101
 Беленькая С. В.99
 Белова Л. Л.605
 Беловежец Л. А.243
 Беловежец Т. Н.233, 550
 Белов С. В.483
 Белоусов А. С.203
 Белоусова И. А.503
 Беляева Е. Д.440
 Белялетдинова И.437
 Беннати М.306
 Бердиева С. Б.462
 Бердникова А. А.14
 Бережной А. К.407
 Березовская М. Ю.748
 Бершакский Я. В.322
 Бикаева И. О.28
 Биктимиров А. Р.68
 Бирулина Ю. Г.577
 Бирюков М. М.307, 664
 Бирюкова Е. С.309
 Бирюкова О. Д.587
 Блинов А. Г.268
 Блинова Е. А.442
 Бобров Н. В.76
 Богатова К. С.579
 Богданова А. С.309
 Богданова Е. А.15
 Боголюбова А. Н.362
 Боднев С. А.217
 Божокин М. С.183
 Бокша И. С.162
 Болгарова Е. В.517
 Болдинова Е. О.581
 Болдырев Н. Д.444
 Болдырева Д. И.30
 Болотник Е. В.271
 Большакова А. С.696, 761
 Бондарева Н. Е.736
 Бондаренко Е. В.445
 Боргоякова М. Б.179, 240, 340,
 520, 646, 772, 780
 Борисова Н. И.447
 Борщевский В. И.403, 726
 Босенко Н. С.103
 Бочаров Э. В.322, 593
 Бочкарева М. Д.105, 138
 Бояринцева А. Ю.449
 Брагина О. Д.754
 Бриг П. И.680
 Брожик Д. С.334
 Брусенцев Е. Ю.379
 Брызгунова О. Е.778
 Брюшкова Е. А.643
 Буйко Е. Е.577
 Булатов Э. Р.114, 146
 Булгаков Т. К.583
 Бульгин А. С.585, 752
 Бульгина Е. А.652
 Бульнина С. С.142
 Бунева В. Н.680
 Буракова Л. П.376
 Бурлак В. А.558
 Бурмистрова Н. А.53
 Бутвилловская В. И.285
 Бутенко А.437
 Быков А. Г.149
 Быков Р. О.451
 Бычкова Т. М.398
 Валеева Л. Р.722
 Валембахов И. С.587
 Валиуллина А. Х.114
 Ванцева О. А.423
 Василевский Д. И.616
 Василисков В. А.120
 Васильева А. А.709
 Васильева Е. В.302, 367, 661
 Васильева С. В.566
 Васильева Ю. А.107, 758
 Васильченко Н. Г.189
 Васютина М. Г.674
 Вахрушева А. В.239
 Вербенко В. Н.334
 Верновская В. И.315
 Веснина А. Д.108

- Ветрова А.173
Ветрова А. Н.110
Вечкапова С. О.589
Винокуров А. Ю.389
Владимиров Г. К.41
Власенко Н. В.515
Власов И. Н.65
Власов М. Е.454
Воденеев В. А.385
Волкова А. А.54
Волкова Е. С.758
Волкова М. В.309
Волкова Н. В.170
Волкова О. Ю.233
Вологжанникова А. А.583
Володина С. И.481
Володяев И. В.41
Волчков П. Ю.635
Вольнец М. О.12, 49, 51, 554
Воробьева М. А.275
Воронина Е. С.648
Воронкова К. А.138
Воронкова О. В.577
Воронов И. В.130
Воронцова Ю. Е.624
Воропаев Г. С.311
Вострикова М. А.754
Вражнов Д. А.739
Врублевская В. В.698
Высочинская В. В.122, 289,
456, 591
Гавриленко А. Д.17
Гавриленкова А. А.327, 593
Гаврилов Ю. К.317
Гаврилова Н. В.456, 473
Гаврилук В. Н.134
Гавриш М. С.694
Гаджиева Э. П.648
Гаджимурадова А.628
Гайдученко Е. С.598
Галеева А. Г.458
Галемина И. Е.668
Галимова А. Р.112
Галушкина З. М.162
Галушко А. С.359
Гамаюнов С. В.387
Ганеева И. А.114
Гаптулбарова К. А.594, 609, 662
Гарипова А. И.313
Гашникова М. П.470
Гашникова Н. М.470, 562
Генаев А. М.306
Герасимова Т. П.736
Герашенко Т. С.577, 754
Гервас П. А.684
Герцен М. М.116
Гилева М. С.596
Гильмутдинова А. И.107, 758
Гифер П. К.315
Гладкова Н. Д.387
Гладышева А. В.763
Глазова О. В.635
Глазунова Е. В.28
Глотов В. М.739
Глухов С. И.317
Голованов А. Б.134
Головенчик В. И.598
Головин А. В.235
Головко Ю. А.217
Гольшев В. М.425, 603
Гондаренко Е. А.760
Гончаров Н. В.614
Гончаров Н. П.268
Гончарук М. В.661
Гончарук С. А.661
Горбенко Д. А.748
Горбунова Е. А.307
Горбунова И. А.501
Горохова Е. А.318
Гороховец Н. В.235, 767
Горошко П. В.20
Горчаков А. А.233
Готовцев Р. А.130
Готфрид Л. Г.470
Грабовой А. С.320
Грановский А. Д.45
Гречканев Г. О.387
Гречко Д. А.105, 138
Григорьева А. Е.775
Григорьева Е. В.573
Григорьева Т. В.652, 672
Григорян Д. А.460
Гридина М. М.35
Гринберг М. А.385
Громов И. А.168
Гудымо А. С.772
Гуков Б. С.22
Гулевич Е. П.334
Гулева Л. Ф.596
Гунбин К. В.26, 39, 66
Гуринович А. С.601
Гусельников С. В.233
Гырнец Е. Ю.118
Даниленко А. В.444
Даниленко Д. М.449, 490
Данилин Н. А.603
Данилова Т. А.162
Данилова Ю. В.107
Дарнотук Е. С.287
Дахновец А. И.45
Дедков В. Г.640, 643
Деев И. Е.593
Дейнеко Е. В.266
Дементьева Е. В.28
Демина Д. С.462
Демченко А. Г.605
Денисов Е. В.656, 712
Денисова В. В.51
Деревенцова А.437
Деревенцова А. В.439
Дерко А. А.464
Дерюшева Е. И.357, 395
Дерягина Е. В.607
Детков Г. М.120
Джассим З. М.631
Дзагурова Т. К.110, 173, 442
Дзантиев Б. Б.219
Диб Н.193
Дидыч Д. А.659
Дикая В. А.24
Диченко Я. В.728
Дмитриева Д. А.403
Дмитриенко Е. В.207, 221, 568
Добровольская О. А.122, 289, 456
Добродеев А. Ю.734
Довбыш О. В.591
Долгашева Д. С.594, 609, 662, 765
Долгова А. С.640, 643
Должикова О. А.124
Долотова С. М.322, 327
Домнин П. А.612, 626
Доронин С. А.776
Дорохин А. С.126
Дорошенко В. О.614
Драчева К. В.616
Дрозд В. Д.215
Дрозд В. С.618
Дронова Т. А.620
Дружкова И. Н.349
Друзяка О. Р.464
Дубовицкий Н. А.464
Дубровская Э. В.466, 479
Дудаев А. Е.128
Дурьманов М. О.309
Дыкина Н. В.468
Дымова М. А.701
Дырхеева Н. С.782
Дьяченко А. А.168
Евгенов И. В.72
Евдокимов И. Ю.209, 273
Егоров А. Е.311
Егоров А. Н.130
Егорова М. А.591
Егорова М. С.110, 173
Ежов В. Ф.334
Елгаева Е. Е.14
Елпаева Е. А.122, 289, 456
Елфимов К. А.470
Ельчанинов В. В.99
Ельчанинова С. А.477
Ендуткин А. В.377
Еремеева Е. В.376
Ермаков Е. А.680
Ермаченко Е. Д.24

- Ермолаева Е. А.445
 Ермолаева С. А.302, 367, 612,
 626, 724
 Еропкин М. Ю.449
 Ерошенко Г. А.564
 Ерш А. В.253
 Ершов Н. И.78
 Ефименко Б. Э.26, 39, 43
 Ефимова С. С.329
 Ефстифеева С. С.507
 Жалсанова И. Ж.656
 Жарков Д. О.377
 Жарков Т. Д.215, 568
 Жданова П. В.198
 Жегло Д.648
 Желначева П. В.359
 Жердев А. В.219
 Жеремян Э. А.132
 Жильникова М. В.622
 Жирнова И.628
 Жмурина М. А.698
 Жолобова О. О.258
 Жуйков Д. А.324
 Жуков С. А.568, 571
 Жукова Ю. В.49
 Жумалин А.628
 Журавлев А. М.134
 Журавлев Е. С.231
 Журавлёв Е. С.680
 Забродская Я. А.456, 473, 591
 Заварыкина А. В.383
 Заволока Е. Л.624
 Завьялов Е. Л.49
 Загитова Р. И.774
 Загорская А. А.266
 Загрядская Ю. А.322, 327, 726
 Задесенец К. С.35
 Задорожный А. М.136, 179,
 240, 340
 Зайковская А. В.217, 780
 Зайнутдинов С. С.475
 Зайцев В. Ю.387
 Зайцев К. В.51
 Закиян С. М.782
 Закревский Д. Э.307, 664
 Закрытная Д. С.421
 Замятнин-мл. А. А.235, 767
 Заседателева О. А.120
 Захарова А. А.329
 Захарова Е. Ю.573
 Захарченко А. Е.626, 724
 Здобнова Т. А.385
 Зеленов Д. В.668
 Зенкова А. К.138
 Зенкова М. А.571, 650, 716
 Зеньков А. В.331
 Зерний Е. Ю.583
 Зигангирова Н. А.736
 Зиганшин А. М.140, 142
 Зиганшина Э. Э.140, 142
 Зимонина А. А.144
 Злобовская О. А.28
 Змиевская Е. А.114, 146
 Зорук П. Ю.30
 Зотина Т. А.372
 Зотова Л.628
 Зрилова Ю. А.398
 Зубарева Е. В.103
 Зубринкин Д. А.458
 Зуев Е. В.435
 Зухайб М.195
 Зюзин М. В.654
 Зяблицкая Е. О.477
 Ибрагимова М. К.662
 Иванов А. В.239
 Иванов А. М.369
 Иванов В. В.577
 Иванов В. К.371
 Иванов И. В.134
 Иванова Д. Н.334
 Иванова К. И.179, 772
 Иванова С. А.680
 Ивин Ю. Ю.110
 Ивкина Д. И.229, 466, 479
 Игнатъев Г.437
 Игонина Т. Н.379
 Идота Э. Э.481
 Изосимова А. В.405, 423
 Ильина Е. С.782
 Ильичёв А. А.179, 240,
 340, 772, 780
 Ильичева Е. Ю.631
 Ильичева Т. Н.179, 772
 Ильчибаева Т. В.718
 Иматдинов А. Р.144, 466,
 479, 507
 Иматдинов И. Р.217, 229,
 479, 507, 763
 Иншакова А. М.287
 Ионов Я. А.148
 Иркитова А. Н.209
 Исаев А. А.239
 Исаева А. С.481
 Исакова Ж. Т.633
 Итани Т. М.451
 Ишемгулов А. Т.336
 Ишмухаметов А.110, 173
 Ищук С. А.96, 151, 291
 Кадилова Ф. Р.31
 Кадисон К. В.149
 Казаков А. С.395
 Казаков М. С.389
 Казакова А. В.151
 Казанова Н. К.105
 Казаринов К. Д.287
 Казарян М. С.678
 Казиахмедова С. А.635
 Казиева А. Ю.153
 Кайшева А. Л.690
 Какоткин В. В.61, 556
 Калинин А. И.407
 Калинина Т. С.587
 Калиш С. В.181
 Камаева Д. А.680
 Камалов М. И.195
 Камынина А. В.322
 Канаева В. А.34
 Канарская М. А.338
 Каночкина М. С.112
 Капитонова М. А.640
 Карабут М. М.355
 Карамушка Н. М.132
 Карганова Г. Г.437, 445, 499
 Карелина К. В.155
 Каримова Р. Г.304, 313, 318
 Карицкая П. Е.72
 Карлин Д. Л.334
 Карпенко Л. И.136, 179, 240,
 255, 340, 520,
 646, 772, 780
 Карпец И. О.72
 Каргашов М. Ю.166
 Карчин К. В.262
 Каспаров А. К.362
 Кель А.306
 Кечко О. И.374
 Ким А. Е.103
 Кипень В. Н.633
 Кириленко К. М.558
 Кириченко А. Д.643
 Кисаков Д. Н.179, 240, 340,
 646, 772, 780
 Кисакова Л. А.179, 240,
 340, 646, 772, 780
 Кислова А. В.648
 Кичеева А. Г.409
 Кичкина Д. О.650
 Клементьев С. В.158
 Климина К. М.30
 Клинов Д. В.309
 Клочков В. В.361
 Князькова А. И.739
 Коваленко А. В.652
 Коваленко С. Г.343
 Коваль О. А.307, 622, 664
 Коврижников А. В.564
 Кожевникова О. С.703
 Козлов А. П.31
 Козлов В. В.596
 Козлов Д. В.231
 Козлов Д. С.355, 654
 Козлова П. К.741
 Козырева С. Ю.35
 Коконцев Д. А.317

- Колбасова О. Л.454
Колегова Е. С.656, 712
Колесник О. В.320, 345
Колманович Д. Д.371
Колмогоров И. М.175
Колоколов М. И.347
Колосов П. В.185
Колосова Е. А.187, 477
Колосова Н. Г.411, 703
Колосова Н. П.444
Колпаков Ф. А.37
Колпакова Д. Е.262
Колпашиков Д. М.215, 618
Кольцов А. Ю.483
Кольцова Г. С.483
Комарова Т. В.281
Комарова А. Д.349
Комарова Н. В.160
Комарова Я. В.674
Комина А. К.485
Комиссаров А. Б.490
Комиссарова Т. В.462
Комлева П. Д.658
Кондратьева А. Р.423
Кондратьева Е. В.605
Кондратьева Л. Г.659
Кондрахин П. Ю.37
Коновалова Н. И.449
Кононихин А. С.612
Кононова Л. А.656
Кононова П. А.351
Конончук В. В.587
Конощенко М. Ю.778
Константинова С. В.162
Коняхина Ю. В.487
Кополева Е. А.164
Корнаков И. А.138
Корнеев К. В.132, 743
Корнеев Е. В.45
Корнилов Ф. Д.661
Коробейников В. Ю.754
Королев М. А.275
Коротин А. В.483
Короткова И. А.517
Костромицкий Д. Н.734
Котб О. М.334
Котлобай А. А.774
Котов И. А.515
Коханенко А. А.558
Кошель А. А.39
Кошель Е. И.74
Кравцова Е. А.609, 662, 765
Кравченко С. В.353
Красильников И. В.239
Красковская Н. А.201
Красникова С. И.772
Кратасюк В. А.413
Крахалев М. Н.372
Кресова У. А.442
Кривошеина Е. И.166
Критченков И. С.349
Круглов И. И.281
Крумкачева О. А.347, 418
Крутько С. А.483
Крылов Д. П.355, 654
Крячкова Н. В.307, 664
Куваева Е. Е.666
Кудров Г. А.240, 475, 780
Кудря К. С.490
Кудрявцев А. В.45, 776
Кудрявцев К. В.361
Кудряцева А. А.745
Кудрякова И. В.668
Кудряшева Н. С.320, 331, 345, 409
Кудряшов Д. А.454
Кудряшов Т. А.357
Кудряшова Е. В.175
Кузнецова А. А.205
Кузнецова В. Е.705
Кузнецова Д. С.76, 355, 654
Кузнецова Е. А.317
Кузьменко Т. П.383
Кузьмин А. И.562
Кузьмич А. И.659
Кузьмичев П. К.322
Кукушкина Т. А.511
Кулемзин С. В.233, 550, 676
Кулешов Д. О.168
Кулешова Т. Э.359
Кулигина Е. В.550, 676
Куликов А. В.658
Куликов В. В.170
Куликова Д. Б.670
Куликова Е. А.730
Куликова Л. И.690
Куликова Ю. В.158
Кульбакин Д. Е.656, 712
Кулябин В. А.171
Кумыкова З. Х.696, 761
Купраш Д. В.132, 743
Куприянова Е. А.672
Купрюшкин М. С.215, 568, 571
Курашев С. Б.103
Курашова С. С.110, 173
Курбатова Т. В.31
Куренинова Т. В.209
Курилин В. В.12, 49, 554,
585, 752
Куркин Т. С.403, 726
Курносов А. С.28
Курченко О. М.225
Кутырева М. П.146
Кучаев Е. С.361
Лаврик О. И.782
Лавров А. В.605
Лаврова Д. Г.177
Лазукин А. А.250
Лактионов П. П.778
Лапа С. А.283
Ларионова И. В.80, 712
Ларионова М. Д.376
Ларичев В.437
Ласточкина Е. Э.758
Латыпов В. Ф.105
Лаушкина В. О.674
Ле-Дейген И. М.175
Лебедев Т. Д.705
Левашова А. И.285
Левицкий Д. И.374
Левковская Г. М.362
Левченко И. Н.41
Легостаев С. С.493
Леконцева Н. В.756
Леонтьева А. А.550, 676
Леонтьевская Е. А.668
Леонтьевская Н. В.668
Лепик К. В.674
Лепикаш Р. В.177
Легута С. Н.336
Линге И. А.659
Липайкин С. Ю.126
Липагова Е. А.678
Липинская Т. П.598
Лисок А. В.24
Литвиненко В. В.302, 367
Литвинова В. Р.179
Литвяков Н. В.594, 609,
662, 741, 765
Литов А. Г.445, 499
Литус Е. А.395
Лобанова В. В.43
Логинова А. М.464
Логинова М. М.387
Ложков А. А.456, 473
Ломзов А. А.306, 338,
393, 425, 566
Лопатникова Ю. А.12, 49, 554
Лукашев А. Н.433
Лунев Е. А.212
Лунин В. Г.162
Лутковский Р. Ю.493
Любайкина Н. А.327
Лямина С. В.181
Лянгузов А. Ю.369
Ляпейкова Е.437
Лящук А. М.162
Магазенкова Д. Н.631
Мажед Ж. Х.110
Мазунин И.66
Мазуркова Н. А.501, 511
Майорова К. А.277
Макаревич Е. В.501
Макаров В. В.28
Макарова А. В.581

- Макарова И. В.736
 Макарова К. А.607
 Макарова К. П.646
 Макуха В. В.462
 Малахова А. А.782
 Малеева А. В.45
 Малиновская Л. П.35
 Малооголовкин А. С.481
 Малыгина Н. М.369
 Мальков Д. И.97
 Мальшакова Б. А.225
 Мамаева П. В.175
 Маматкулов К. З.421
 Манукян А. А.581
 Манухов И. В.745
 Маркарян А. Ю.517
 Маркелова М. И.652, 672
 Марков А. В.650, 716
 Маркович В. А.765
 Мартемьянов В. В.503, 78
 Мартынов В. А.209
 Мартынова В. В.317
 Марченко В. Ю.179, 444, 772
 Марченков В. В.756
 Марченко Д. М.183
 Маслакова А. А.391
 Масленникова В. С.505
 Маслов Д. Е.462
 Маслов М. А.591
 Маслов Р. Д.185
 Матвеев А. Л.603
 Матюнина Е. А.31
 Матюшенко А. М.374
 Мацвай А. Д.22, 460
 Медведев С. П.573, 782
 Медков М. А.279
 Мейер А.306
 Меламуд М. М.680
 Мельников А. С.709
 Меняйло М. Е.712
 Меркульева Ю. А.187, 475
 Мерцалов И. Б.666
 Механцева К. В.189
 Мехова А. А.720
 Мечетина Л. В.233
 Мещанинова М. И.124
 Милахина Е. В.307, 664
 Милентьева И. С.256, 260
 Милюхина И. В.573, 575
 Минеев К. С.661
 Минина В. И.731
 Миронова Н. Л.750
 Мирошникова В. В.616
 Мифтахова Р. Р.581
 Михайлина А. О.756
 Михайлова А. А.39
 Михайлова А. Г.39, 66
 Михайлова Е. Е.682
 Михайлова Е. Р.183
 Михайлова Н. А.201
 Мишин А. В.403, 726
 Модяева В. П.191, 227
 Можеров А. М.76, 349, 355,
 405, 423, 654
 Молоков А. Ю.684
 Моралев А. Д.650
 Моргунов С. Ю.454
 Моренков О. С.698
 Морозов В. В.774
 Морозова М. Д.191, 227
 Москалюк В. С.730
 Моторина А. О.694
 Моторина Д. М.686
 Мурзакова И. Ф.334
 Мурина Е. А.778
 Муслимов А. Р.674
 Мухаметшин С. А.146
 Муханов В. С.701
 Мысина Е. А.371
 Мышкина Н. М.774
 Навесова Ю. В.372
 Надей О. В.710
 Назаренко Е. А.497
 Назаров К. В.49
 Назарова Е. А.148, 264
 Насонов Д. М.377
 Науменко В. С.718
 Нахметова Ф. М.195
 Наякшин А. М.233
 Невинский Г. А.200, 680, 688
 Невская К. В.594, 609, 741
 Неклесова М. В.193
 Некрасова Е. И.415
 Немашкалова Е. Л.357
 Немцева Е. В.413
 Ненашева В. В.736
 Нетёсов С. В.462
 Нефедова В. В.374
 Нечаева И. А.237
 Никитенко О. В.398
 Никитин А. О.688
 Николаева В. А.195
 Никольский К. С.690
 Никонов О. С.756
 Новак Д. Д.622
 Новокущев Н. В.196
 Новопашина Д. С.124, 306, 603
 Новосадская А. Е.250
 Новоселецкий В. Н.15
 Носова В. О.670
 Нур Ш. А.376
 Нуралов А.628
 Нуштаева А. А.550, 622, 676
 Овчеренко С. С.377
 Окотруб К. А.379
 Олейник Г. А.198
 Олехнович Е. И.30, 34
 Омельченко А. Н.379
 Онопченко А. В.674
 Онхонова Г. С.444
 Орлов А. В.433
 Осадчий Г. Г.39
 Осик Н. А.381
 Осипов И. Д.462
 Осипова З. М.774
 Остальцев И. А.778
 Острова С. А.674
 Остроумова О. С.329
 Отряскин Я. С.692
 Охальников А. Д.694
 Охезин Е. В.499
 Охрименко И. С.322, 327,
 593, 726
 Павлов К. В.322
 Павлова А. С.568
 Павлова Е. Р.309, 391
 Павлова Н. С.696, 761
 Павлова С. В.573
 Падня П. Л.300
 Пак С. В.778
 Пак Ф. А.334
 Панова А. А.47
 Панова Г. Г.359
 Панова О. С.160
 Парамоник А. П.200
 Партевян С. А.65
 Парфенов В. А.612
 Парфенова П. С.201
 Парчайкина М. В.383
 Пастон С. В.334
 Патлай А. А.203
 Патра К.215
 Патрушев С. С.650
 Патышева М. Р.712, 754
 Паширова Т. Н.195
 Пельтек А.164
 Переломов Л. В.116
 Перик-Заводская О. Ю.12, 49,
 51, 554
 Перик-Заводский Р. Ю.12, 49,
 51, 554
 Пермьяков Е. А.395
 Пермьяков С. Е.395
 Пермьякова М. Е.395
 Першина А. Г.594, 609, 741
 Петренко В. С.698
 Петренко О. А.205
 Петров Г. О.701
 Петрова П. А.449
 Петрова Т. А.369
 Петрова Ю. Ю.413
 Петровская Л. Е.327
 Петровский Д. В.690
 Петушкова А. И.767

- Пеунов Д. А.703
 Пивова Е. Ю.454
 Пинтус С. С.56
 Пиняев С. И.692
 Пирогова П. А.385
 Плеханов А. А.387
 Плехова Н. Г.279
 Плотникова М. А.456, 473
 Побожьева И. А.616
 Пожитнова В. О.648
 Поздышев Д. В.281
 Покровский В. С.481
 Полтавченко А. Г.253
 Поляков А. В.678
 Поляков Н. Э.351
 Поляков С. А.705
 Полякова А. А.225, 307, 664
 Полянская А. Ю.309
 Пономарева А. А.734
 Попадьян К. Ю.26, 39, 43, 66
 Попков Е. В.383
 Попов А. Л.371
 Попов Д. Ю.389
 Попова А. С.138
 Попова В. К.207
 Полонова М. С.162
 Порозова Н. О.481
 Потеряев Д. А.435
 Потешкина К. И.707
 Потысьева А. С.709
 Прокопенко Е. С.710
 Просеков А. Ю.108
 Проскура А. Л.589
 Простакишина Е. А.712
 Протопопова Е. В.493
 Проценко М. А.501
 Прудникова Е. Ю.144, 217, 229
 Прусаков К. А.391
 Пучкова Л. В.631
 Пушкарев И. А.209
 Пушкаревская А. А.393
 Пчелина С. Н.573, 575, 616
 Пыхтина М. Б.505
 Пьянков О. В.217, 240, 522, 780
 Пьянков С. А.487, 522
 Растрьгина В. А.395
 Рева Г. В.70
 Ревин В. В.196, 383
 Рекина В. Е.631
 Репин В. И.454
 Решетиллов А. Н.149
 Ри Н.66
 Рихтер В. А.231, 550, 676
 Рогова А.437
 Рогожникова О. Ю.306
 Родимова С. А.76, 355, 654
 Родионов И. В.767
 Роев Г. В.447
 Рожко Т. В.345
 Рожков О. А.562
 Романова А. Д.212
 Романова С. А.407, 419
 Ромодин Л. А.398
 Рошаль С. Б.400
 Рошаль Д. С.400
 Рудакова Н. Л.107, 214, 758
 Рудакова С. В.483
 Рудакова С. Л.468
 Руденок М. М.65
 Руднев В. Р.690
 Рудомётов А. П.136, 179, 240,
 340, 646, 772, 780
 Рудомётова Н. Б.179, 255
 Рузанова В. С.714
 Рыбалко Д. С.215, 618
 Рыболовлев И. Н.65
 Рыжиков А. Б.217, 444
 Рыкова Е. Ю.734
 Рыльцева Г. А.128
 Савватеева Л. В.767
 Савенкова Д. А.217
 Савин И. А.716
 Садова А. А.403, 726
 Сажина М. М.423
 Салахиева Д. В.195
 Салахутдинов Н. Ф.255, 509
 Салимова А. А.618
 Саллум Г.778
 Самарина С. А.718
 Самаринова А. А.739
 Самохвалов А. В.219
 Самусева П. Д.720
 Самылова О. В.205
 Санникова А. В.722
 Санникова Н. И.347
 Санникова Н. Э.418
 Сарангова А. Б.331
 Сафарова П. В.724
 Сафронова А. С.175
 Сафронова Н. А.403, 726
 Сахаров А. А.235
 Саченко А. Б.728
 Сачкова А. С.345
 Сачкова Д. А.405, 423
 Свиридов Ф. С.648
 Святченко В. А.493
 Святченко С. В.444
 Севских Т. А.454
 Седельникова А. Ю.221
 Седых С. Е.200, 688
 Селиванов П. А.223
 Селищев Д. С.231
 Селькова П. А.709
 Селютин О. Ю.351
 Семенов А. В.451
 Семенова Е. К.65
 Семиколенова О. А.124
 Семина Е. В.61, 556
 Сенина А. М.652
 Сенников С. В.12, 49, 51,
 554, 585, 752
 Сенчукова М. А.336
 Сенькова А. В.716
 Сергеев А. А.487, 520
 Сергеева М. В.490
 Сердобинцев П. Ю.709
 Серебренникова К. В.219
 Серова О. В.593
 Сивай М. В.562
 Сивцев А. А.656
 Сидорова А. Е.391
 Силантьев В. Е.203
 Силков А. Н.12, 49, 554
 Сильванович Е. К.225
 Симакова А. В.191, 227
 Симонова О. Б.624, 666
 Синдюкова И. П.454
 Синюшкина С. Д.349
 Синявина Н. Г.359
 Синягина М. Н.652
 Синякова Н. А.658
 Сираева Е. Т.146
 Сироткин А. С.158
 Сироткина М. А.387
 Скарга Ю. Ю.698
 Скворцова Д. Р.95
 Скорынина А. В.171
 Скотникова А. К.730
 Скрипцова К. Е.191, 227
 Скрыбин Н. А.656
 Скуредина А. А.175
 Слепцов А. А.247
 Слонимская Е. М.620
 Слотвицкий М. М.407, 419
 Смирнихина С. А.605
 Смирных Д. В.409
 Смоленцев А. А.411
 Снегирева А. А.229
 Снытникова О. А.411
 Соболева О. А.731
 Соболева П. М.53
 Советский А. А.387
 Соколов А. С.395
 Соколов В. В.54
 Соколова А. С.509
 Соловова О. А.678
 Соловьева А. И.734
 Соловьева М. И.231
 Соловьева О. И.49
 Соловьева Э. Ю.287
 Солонков П. П.233
 Солонкина А. Д.235
 Сопова Ю. В.183
 Сорокина Т. М.678

- Становая А. И.300
 Старикова П. К.451
 Стародубова Е. С.497
 Старостина Е. В.179, 240,
 340, 520, 772
 Старчевская М. Е.444
 Старченко И. В.243
 Стасевич Е. М.132
 Сташкевич Д. С.769
 Стенкова А. М.707
 Степаненко Е. А.736
 Степанов Г. А.231, 680
 Стеценко И. Ф.22, 460
 Стойков И. И.300
 Ступак В. В.739
 Ступак Е. В.739
 Субботина А. О.503
 Субботина Е. Ю.191, 227
 Суворова В. В.237
 Суворцев Н. В.379
 Сувормин О. С.413
 Суханицкий С. В.24
 Суханов А. А.306
 Сухер М. М.483
 Сухинина Е. В.741
 Сухих С. А.97
 Сухова М. М.239
 Сушко Е. С.331, 409
 Сысолятина Е. В.302, 367
 Табанюхов К. А.505
 Тагиров Т.581
 Тамкович С. Н.775
 Таранин А. В.233, 435
 Тарантул В. З.736
 Тарасевич В. Ф.362
 Тарасова А. А.734
 Тарлачков С. В.668
 Телегина Д. В.411, 703
 Теодорович Р. Д.110, 173
 Терновой В. А.155
 Тигеева Е. В.179, 240, 340, 646, 780
 Тикунова Н. В.682
 Тимофеева А. М.200, 688
 Тимохин К. М.243
 Тимченко Н. А.311
 Титов А. А.160
 Титова К. А.487, 520
 Титок М. А.601
 Тихомиров А. Д.736
 Тишин А. Е.507, 763
 Тищенко А. А.670
 Тищенко С. А.509
 Ткаченко Е. А.110, 173, 743
 Томашевич Н. С.245
 Томилова Ю. Э.462
 Торгашева А. А.35
 Торгунакова А. В.731
 Торьмьшев В. М.306
 Торопов В. А.24
 Тотменин А. В.562
 Третьяков Е. О.66
 Трифионов С. В.324
 Трифионова Н. Е.415
 Троев И. П.130, 247
 Троицкая О. С.622
 Тронов В. А.415
 Трофимов Д. Ю.696, 761
 Трушлис Э. В.250
 Туник С. П.349
 Турченко Ю.437
 Тучинская К.437
 Тыртышная Е. С.413
 Тюрин В. Ю.522, 763
 Уварова А. Н.132, 743
 Уварова Е. А.266, 696, 761
 Уверский В. Н.395
 Угольников Я. А.54
 Усанов С. А.728
 Усачев К. С.361
 Усенко Т. С.573, 575
 Устенко Е. В.162
 Устюгова А. С.132
 Уткина А. А.745
 Уфимцева Е. Г.596
 Ушкаленко Н. Д.253
 Файзуллина Д. Р.440
 Фандо А. А.179, 255
 Фаррух М.631
 Федин А. И.287
 Федин М. В.347
 Федина Е. Д.736
 Федоренко К. К.400
 Федоров А. А.754
 Федорова В. А.724
 Федорова И. К.656, 712
 Фефилова Е. А.747
 Филатов А. В.435
 Филатов П. В.253, 748
 Филатова А. А.750
 Филатова А. П.56
 Филина Ю. В.581
 Филиппова Е. И.501, 511
 Филиппова Ю. Г.49, 554
 Фишер М. С.12, 49, 554,
 585, 752
 Фишман В. С.35
 Флеер М. В.562
 Фокина А. Д.256
 Фоменко В. В.255, 351
 Фоменко Н. Г.258
 Фомин Э. В.334
 Фролов Г. С.458
 Фролова А. А.754
 Фролова А. С.260, 262
 Фролова Ш. Р.343
 Хайдара М. К.558
 Хайретдинова А. Р.756
 Халиков А. И.334
 Хамид З. М.616
 Ханнанов А. А.146
 Хантакова Ю. Н.585, 752
 Хасанов Д. Г.264
 Хасанов Д. И.107, 214, 758
 Хасаншина З. Р.105, 138
 Хафизов К. Ф.447, 515
 Хесуани Ю. Д.612
 Хильяс И. В.214
 Хлынова Т. А.347, 418
 Ходорковский М. А.709
 Ходырева С. Н.782
 Хозяинова А. А.464, 712
 Холод Н. С.483
 Холодилов И. С.437, 445
 Холошенко И. В.760
 Хомутов Е. В.60
 Хорошкина Н. Н.262
 Хотин М. Г.183, 201
 Хохлачев М. В.195
 Хохлова И. Ю.61
 Храпов С. Е.327
 Хуснутдинова Д. Р.652
 Цабай П. Н.696, 761
 Цветая В. А.407, 419
 Цветикова С. А.74
 Цгоев Ч. А.63
 Цейликман Д. В.72
 Центалович Ю. П.381, 411
 Циммерман Е. Л.289, 456
 Цишевская А. А.763
 Цмокалюк Д. А.266
 Цыбко А. С.718
 Цыганов М. М.765
 Цыгичко А. А.245, 513
 Цыденова Д. С.594
 Цыденова И. А.609, 662, 765
 Цымбаревич И. В.239
 Чалапа В. И.451
 Чаленко Я. М.724
 Чаньшев М. Д.515
 Чеканов А. В.287
 Чекиров К. Б.633
 Чепикова О. Е.235, 767
 Чепурнов Г. Ю.268
 Чердынцева Н. В.620, 684,
 734, 754
 Черезов Р. О.624
 Черкасова О. П.739
 Черная А. И.271
 Черников И. В.571
 Черноловская Е. Л.571
 Черных В. Б.678
 Чернышев С. Э.191, 227
 Чернышева А. Е.517
 Чернышов Н. А.577

- Чеснокова А. С.72
 Чикаев А. Н.233
 Чикаев Н. А.233
 Чиркова В. Ю.273
 Чистяков В. А.189
 Чистякова Н. В.447
 Чойнзонов Е. Л.712
 Чуб Е. В.166
 Чубаров А. С.347, 566
 Чудинов А. В.120, 283, 285, 705
 Чумакова А. Б.65
 Чумачёва Ю. В.769
 Чупахин Е. Г.556, 61
 Чухрова Е. С.74
 Шабалина А. В.640
 Шабалкин И. Д.148
 Шадрин А. М.171
 Шадрина М. И.65
 Шайтан К. В.15
 Шакарян А.437
 Шакиров Е. В.722
 Шакирова А. И.674
 Шалджян А. А.456
 Шалик И. К.225
 Шамаль Н. В.362
 Шаманский В.66
 Шарабрин С. В.136, 772
 Шарипова М. Р.107, 214,
 722, 758
 Шаршов К. А.464
 Шастина Н. С.287
 Шатунова Е. А.275
 Шахова Е. С.774
 Швейгерт И. В.307, 664
 Шebarдина Н. Г.583
 Шевелева М. П.357, 583
 Шевцов М. Б.403, 726
 Шевченко А. Р.277
 Шевченко О. В.279
 Шевченко Ю. А.12, 49, 51, 554
 Шелухина И. В.760
 Шепелева А. А.387
 Шеремет А. Б.736
 Шернюков А. В.306, 377
 Шершов В. Е.705
 Шестопалов А. М.464
 Шефер А. А.775
 Шешукова Е. В.281
 Шиабиев И. Э.300
 Шикун Х.49, 554
 Шипелова А. В.287
 Шиповалов А. В.240, 475, 780
 Шипулин Г. А.22, 28, 460
 Ширманова М. В.349, 405, 423
 Широкий Н. И.74
 Шитикова Е. Ю.389
 Шишкин И. Ю.283
 Шишкина Л. Н.509
 Шишова А. А.439
 Шмелев М. Е.203
 Шмурак В. И.291
 Шокина В. А.776
 Штаут М. И.678
 Штылев Г. Ф.285
 Шувалов О. Ю.747
 Шульгина И. С.475, 520, 522
 Шульц Э. Э.650
 Шутиков А. А.421
 Шутко Е. В.778
 Шутова А. М.387
 Щагина О. А.678
 Щеглов Б. О.68, 70
 Щеглова С. Н.68, 70
 Щелина Е. В.674
 Щелконогов В. А.287
 Щелкунов С. Н.487, 520
 Щербаков Д. Н.99, 170, 185, 187,
 255, 273, 477, 99
 Щербаков М. В.191, 227
 Щербакова А. Е.74
 Щербакова Н. С.255
 Щербакова С. А.72
 Щербакова Ю. В.205
 Щербин Д. Г.300
 Щеславский В. И.349
 Щечкин И. Д.76
 Щур В. В.728
 Щур В. Л.60
 Эльдиб А. А.215, 618
 Юдкин Д. В.217
 Южакова Д. В.405, 423
 Юрина А. А.550, 676
 Юртова А. В.692
 Юрченко А. В.289
 Юсубалиева Г. М.405
 Юшин И. И.425
 Якимова М. Е.78
 Яковлев В. А. 179, 240, 340, 646, 780
 Яковлев И. А.317
 Яковлева О. В.579
 Якубицкий С. Н.487, 520
 Ямпольский И. В.774
 Ямских А. А.782
 Ямщиков П. С.80
 Янцевич А. В.728
 Яньшолле Л. В.775
 Яровая О. И.507
 Яровиков А. С.291
 Яшин К. С.423

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ I. БИОИНФОРМАТИКА

Bocharnikova M. E., Afonnikov D. A. DEVELOPMENT OF A COMPUTATIONAL PIPELINE TO SEARCH AND ANALYZE GENES OF MULTIDOMAIN PROTEIN FAMILIES	3
Borodko D. D., Sukhorukov V. N., Nikiforov N. N., Omelchenko A. V. SEARCH FOR POTENTIAL MASTER REGULATOR MOLECULES RESPONSIBLE FOR EARLY STAGES DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS.....	4
Gusarov Y. S., Mikhailova A. G., Iliushchenko D. V., Efimenko B. E., Gunbin K. V., Burskaya V. O., Popadin K. Y. MITOCHONDRIAL DNA A _H > GH MUTATION AND ITS ASSOCIATIONS WITH BIRDS LIFE-HISTORY TRAITS.....	5
Iliushchenko D. V., Efimenko B. E., Gunbin K. V., Popadin K. Y. DEEP MUTATIONAL SPECTRUM OF MITOCHONDRIAL GENOME IN VERTEBRATES AS A NEW TYPE OF SPECIES — SPECIFIC MOLECULAR PHENOTYPE.....	6
Kipen V. N., Snytkov E. V. METHODOLOGICAL APPROACH FOR <i>IN SILICO</i> GENOTYPING — VALIDATION ON SEQUENCING RESULTS FOR <i>CANIS LUPUS FAMILIARIS</i>	7
Kipen V. N., Snytkov E. V. BIONFORMATIC ANALYSIS OF THE GENOMES OF WILD AND DOMESTIC ANIMALS OF THE SPECIES <i>SUS SCROFA</i> TO UPGRADE THE “SWINE/WILD BOAR” DIFFERENTIATION MODEL.....	8
Kipen V. N., Snytkov E. V. BIONFORMATIC ANALYSIS OF THE GENOMES OF WILD AND DOMESTIC ANIMALS OF THE SPECIES <i>CANIS LUPUS</i> TO UPGRADE THE “WOLF/DOG” DIFFERENTIATION MODEL.....	9
Molobekova C. A., Kukoeva T. V., Shoeva O. Y. COMPARATIVE GENETIC AND PHENOTYPIC ANALYSIS OF NEAR-ISOGENIC BARLEY LINES WITH ANTHOCYANIN GRAIN PIGMENTATION.....	11
Алрхмун С., Перик-Заводская О. Ю., Волынец М. О., Лопатникова Ю. А., Шевченко Ю. А., Фишер М. С., Перик-Заводский Р. Ю., Курилин В. В., Силков А. Н., Сенников С. В. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ CD8 ⁺ Т-КЛЕТОК, СПЕЦИФИЧНЫХ К ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОМУ АНТИГЕНУ HER-2/NEU, С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МРНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК И НЕЙРОННОЙ СЕТИ ERGO-II.....	12
Бердникова А. А., Елгаева Е. Е. ВЫЯВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ РЕФЕРЕНСНОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ИМПУТАЦИИ ДАННЫХ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РОССИЯН НА ПРИМЕРЕ ВЫБОРКИ RUDDS	14
Богданова Е. А., Шайтан К. В., Новоселецкий В. Н. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ И МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ АФФИННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ В БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ.....	15
Гавриленко А. Д. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ.....	17
Горошко П. В., Бараблина Ю. Е. РЕЗУЛЬТАТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ВО ВЛАГАЛИЩЕ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 16S РРНК У ЖЕНЩИН, ПЛАНИРУЮЩИХ БЕРЕМЕННОСТЬ С ПОМОЩЬЮ ВРТ	20
Гуков Б. С., Стеценко И. Ф., Мацвай А. Д., Шипулин Г. А. PRIMERCOV — ПРОГРАММНЫЙ АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЫРОЖДЕННЫХ ПРАЙМЕРНЫХ СТРУКТУР	22
Дикая В. А., Торопов В. А., Суханицкий С. В., Ермаченко Е. Д., Лисок А. В. РАЗРАБОТКА ПРОГРАММЫ ДЛЯ АНАЛИЗА НЕСПЕЦИФИЧНОГО ОТЖИГА ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ НА ГЕНОМАХ ОРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗЫ ДАННЫХ NCBI И ВЫРАВНИВАНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ АЛГОРИТМОМ BLAST	24

Ефименко Б. Э., Попадьян К. Ю., Гунбин К. В. РЕКОНСТРУКЦИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ — NEMU ПАЙПЛАЙН	26
Злобовская О. А., Дементьева Е. В., Курносое А. С., Глазунова Е. В., Бикаева И. О., Макаров В. В., Шипулин Г. А. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА МЕТОДАМИ 16S NGS И ПЦР-РВ.....	28
Зорук П. Ю., Болдырева Д. И., Олехнович Е. И., Климина К. М. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ВЫВЕДЕНИЯ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ ИЗ ОРГАНИЗМА МЫШЕЙ	30
Кадирова Ф. Р., Матюнина Е. А., Курбатова Т. В., Козлов А. П. ЭВОЛЮЦИЯ ОПУХОЛЕВОГО ГЕНА <i>AZGP1</i> И ФОРМИРОВАНИЕ ЕГО ФУНКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОЖИРЕНИЕМ.....	31
Канаева В. А., Олехнович Е. И. ПОИСК УНИВЕРСАЛЬНЫХ МЕТАГЕНОМНЫХ МАРКЕРОВ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОТВЕТОМ НА ИММУНОТЕРАПИЮ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАКА	34
Козырева С. Ю., Гридина М. М., Торгашева А. А., Фишман В. С., Задесенец К. С., Малиновская Л. П. ПОИСК И ОПИСАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ХРОМОСОМЕ 1А У БОЛЬШОЙ СИНЦЫ (<i>PARUS MAJOR</i>) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА NI-C	35
Кондрахин П. Ю., Колпаков Ф. А. МНОГОУРОВНЕВАЯ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРИПАДКОВ.....	37
Кошель А. А., Осадчий Г. Г., Михайлова А. А., Михайлова А. Г., Ефименко Б. Э., Гунбин К. В., Попадьян К. Ю. РАЗЛИЧИЯ МУТАЦИОННОГО СПЕКТРА МТДНК ТЕРМИТНЫХ И НЕТЕРМИТНЫХ ТАРАКАНОВ АССОЦИИРОВАННЫ С ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ	39
Левченко И. Н., Владимиров Г. К., Володяев И. В. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА C В КОМПЛЕКСЕ С КАРДИОЛИПИНОМ	41
Лобанова В. В., Ефименко Б. Э., Попадьян К. Ю. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ БАРКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА МУТАГЕНЕЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НЕМАТОД.....	43
Малеева А. В., Дахновец А. И., Грановский А. Д., Корнеев Е. В., Кудрявцев А. В. АННОТАЦИЯ И КЛАСТЕРИЗАЦИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НАНОТЕЛ АКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПЛАТФОРМАХ ILLUMINA И OXFORD NANOPORE	45
Панова А. А. СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВИРУСНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ ГРУППЫ ИНДИВИДОВ С УЧЕТОМ ИХ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ	47
Перик-Заводская О. Ю., Перик-Заводский Р. Ю., Шевченко Ю. А., Фишер М. С., Вольнец М. О., Алрхмун С., Назаров К. В., Алсаллум А., Лопатникова Ю. А., Курилин В. В., Жукова Ю. В., Филиппова Ю. Г., Соловьева О. И., Завьялов Е. Л., Акахори Я., Шику Х., Силков А. Н., Сенников С. В. СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК РАСКРЫВАЕТ ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ NY-ESO-1-СПЕЦИФИЧНЫХ TCR Т-КЛЕТОК В МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ SK-MEL-37	49
Перик-Заводский Р. Ю., Перик Заводская О. Ю., Шевченко Ю. А., Вольнец М. О., Алрхмун С., Денисова В. В., Зайцев К. В., Сенников С. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУННОГО ТРАНСКРИПТОМА ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК	51
Соболева П. М., Бурмистрова Н. А. СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ПРОЦЕССЕ ИМПРИНТИНГА	53
Угольков Я. А., Волкова А. А., Соколов В. В. МЕХАНИСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИНТЕРФЕРОН-ОПОСРЕДОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ.....	54
Филатова А. П., Пинтус С. С. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ САЙТОВ НАЧАЛА ТРАНСКРИПЦИИ	56
Хомутов Е. В., Арзыматов К., Щур В. Л. НЕЙРОСЕТЕВОЙ ПОДХОД К АППРОКСИМАЦИИ ЛОКАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ КОАЛЕСЦЕНТНЫХ ВРЕМЕН.....	60
Хохлова И. Ю., Какоткин В. В., Агапов М. А., Семина Е. В., Чупахин Е. Г. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОКИНГА ПРИ СОЗДАНИИ ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНКИНАЗЫ МАРК14 — ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ МИШЕНИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА	61
Цгоев Ч. А. РЕАКЦИОННО-ДИФфуЗИОННАЯ МОДЕЛЬ ИНФАРКТА МИОКАРДА.....	63
Чумакова А. Б., Руденок М. М., Семенова Е. К., Партевян С. А., Рыболовлев И. Н., Шадрин М. И., Власов И. Н. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ТКАНЯХ МОЗГА МЫШЕЙ С МФТП-ИНДУЦИРОВАННЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОГРАММНОГО ПАКЕТА DESEQ2.....	65

Шаманский В., Третьяков Е. О., Михайлова А. Г., Ри Н., Мазунин И., Гунбин К., Попадьян К. НА ПУТИ К КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТЫ СТАРЕНИЯ: ОЦЕНКА ХРУПКОСТИ КАК ФАКТОРА РИСКА ОБРАЗОВАНИЯ ДЕЛЕЦИИ МТДНК	66
Щеглов Б. О., Щеглова С. Н., Биктимиров А. Р. РАЗРАБОТКА ФОРМАЛИЗОВАННОГО НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТА В ОТДЕЛЕНИИ НЕЙРОХИРУРГИИ МЕДИЦИНСКОГО КОМПЛЕКСА ДВФУ	68
Щеглов Б. О., Щеглова С. Н., Рева Г. В. АПРОБАЦИЯ ОБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПАП-ТЕСТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ГРАФИЧЕСКОГО ОБРАБОТЧИКА И БАЗЫ ЗНАНИЙ	70
Щербакова С. А., Карицкая П. Е., Чеснокова А. С., Карпец И. О., Евгенов И. В., Цейликман Д. В. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ ГЕНЫ, ПРОГНОЗИРУЮЩИЕ ОТВЕТ НА ТЕРАПИЮ ТАМОКСИФЕНОМ У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	72
Щербакова А. Е., Широкий Н. И., Чухрова Е. С., Цветикова С. А., Кошель Е. И. ПРИМЕНЕНИЕ ПОДХОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКОВ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ О СОСТАВЕ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА	74
Щечкин И. Д., Родимова С. А., Бобров Н. В., Можеров А. М., Кузнецова Д. С. СОЗДАНИЕ АЛГОРИТМА АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА	76
Якимова М. Е., Мартемьянов В. В., Ершов Н. И. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОДНО- И ДВУХЛЕТНИХ ЦИКЛОВ РАЗВИТИЯ <i>DENDROLIMUS SIBIRICUS</i> НА ОСНОВЕ ДАННЫХ RNA-SEQ	78
Ямщиков П. С., Ларионова И. В. ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУННЫХ КОМПАРТМЕНТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРОЦЕДУРЫ ДЕНОЙЗИНГА ДАННЫХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ТРАНСКРИПТОМИКИ 10X GENOMICS VISIUM	80

РАЗДЕЛ II. БИОТЕХНОЛОГИИ

Andreeva N. Y., Davidyuk Y. N., Sahin S., Zhirnova V. A., Validov S. Z., Khaiboullina S. F., Martynova E. V., Kabwe E. CONFIRMATION OF VIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN PRODUCED IN RECOMBINANT <i>ESCHERICHIA COLI</i> CELLS	82
Arnautova A. O., Aleksakhina I. A., Kayushin A. L., Konstantinova I. D. NEW BENZIMIDAZOLE NUCLEOSIDES	83
Bobkov G. A., Berezovskaya M. Y., Potudanskaya M. O., Rubel M. S. DIFFERENT TYPES OF DNA- NANOSENSORS VISUALIZATION	84
Rybkin I., Humam A., Alahmari M., Orlov M. ENGINEERING POLYMICROBIAL AGGREGATES FOR PETROLEUM BIOTECHNOLOGY	85
Salimova A. A., Drozd V. D., Rybalko D. S., Eldeeb A. A., Dedovskaya A. A., Kolpashchikov D. M. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES RELEASING CASSETTE FOR CANCER THERAPY	86
Sapozhnikova E. N. EXPLORING THE USE OF HERBAL EXTRACTS FOR ACNE TREATMENT	88
Smirnova O. S., Konstantinova I. D. CHEMO-ENZYMATIC SYNTHESIS OF NEW RIBAVIRIN ANALOGS	89
Sounbuli K., Mironova N. L., Markov O. V., Alekseeva L. A. A COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT ISOLATION PROTOCOLS OF MURINE NEUTROPHILS FROM BONE MARROW AND SPLEEN	90
Vidler A. D. HETEROTROPHIC MICROALGAE CULTIVATION TECHNOLOGIES FOR THE PRODUCTION OF USEFUL SUBSTANCES AND BIOPRODUCTS	91
Yuraskina T. V., Sokolova E. N., Fursova N. A., Serba E. M. ENRICHMENT OF YEAST WITH MICROELEMENTS AS AN OPPORTUNITY TO ELIMINATE MICRONUTRIENT DEFICIENCY IN NUTRITION	92
Азоян Д. Т., Скворцова Д. Р. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТА ХИТИНАЗЫ В МЯСНОЙ ОТРАСЛИ	95
Астрелина П. С., Ищук С. А. РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ РЕФОЛДИНГА FC-СЛИТЫХ БЕЛКОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	96
Бабич О. О., Мальков Д. И., Сухих С. А. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ <i>FUCUS VESICULOSUS</i>	97
Белаш Е. А., Балабова Д. В., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н., Ельчанинов В. В. НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ ОВЦЕБЫКА (<i>OVIPOS MOSCHATUS</i>) И ТАКИНА (<i>BUDORCAS TAXICOLOR</i>), ПОЛУЧЕННЫХ В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ ДРОЖЖЕЙ <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i>	99
Белая Т. Д. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХИЩНЫХ ГРИБОВ-ГИФОМИЦЕТОВ	101

Босенко Н. С., Зубарева Е. В., Ким А. Е., Курашев С. Б. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СОСУДИСТОГО РУСЛА ХОРИОАЛЛАНТОИСНОЙ МЕМБРАНЫ КУРИНОГО ЭМБРИОНА В ОБЛАСТИ КОНТАКТА С ПОЛИМЕРНЫМ МАТЕРИАЛОМ, СОДЕРЖАЩИМ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ СТАТИЧЕСКОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ УМЕРЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ.....	103
Бочкарева М. Д., Гречко Д. А., Казанова Н. К., Хасаншина З. Р., Латыпов В. Ф. КОЭКСПРЕССИЯ <i>VITREOSCILLA</i> НАЕМОГЛОБИН В <i>E. COLI</i> ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММА К НИЗКОМУ СОДЕРЖАНИЮ КИСЛОРОДА В ПРОЦЕССЕ ВЫСОКОПЛОТНОСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	105
Васильева Ю. А., Гильмутдинова А. И., Хасанов Д. И., Данилова Ю. В., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. СОЗДАНИЕ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА СУРФАКТИНА В ГЕНОМЕ БАКТЕРИИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	107
Веснина А. Д., Просеков А. Ю. РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ДОБАВОК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ АТЕРОСКЛЕРОЗА.....	108
Ветрова А. Н., Курашова С. С., Егорова М. С., Теодорович Р. Д., Мажед Ж. Х., Ивин Ю. Ю., Ишмухаметов А. А., Ткаченко Е. А., Дзагурова Т. К. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ПУУМАЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO НА МИКРОНОСИТЕЛЯХ.....	110
Галимова А. Р., Каночкина М. С. ТЕХНОЛОГИЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ.....	112
Ганеева И. А., Валиуллина А. Х., Змиевская Е. А., Булатов Э. Р. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА NKG2D CART-КЛЕТОК ПРОТИВ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ЛИГАНДЫ NKG2D.....	114
Герцен М. М., Переломов Л. В. ДЕГРАДАЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ В ВОДНОЙ И ПОЧВЕННОЙ ЭКОСИСТЕМАХ БИООРГАНИЧЕСКИМИ КОМПОЗИЦИЯМИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ.....	116
Гырнец Е. Ю., Асагурова А. М. СКРИНИНГ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ В ОТНОШЕНИИ ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ <i>GALLERIA MELLONELLA</i> L. И ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ <i>CYDIA POMONELLA</i> L.	118
Детков Г. М., Заседагелева О. А., Василисков В. А., Чудинов А. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВРЕМЕНИ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП «ПОЛИМЕРНЫХ ЩЕТОК».....	120
Добровольская О. А., Елпаева Е. А., Высочинская В. В. ПОЛУЧЕНИЕ МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА H7N9, МЕТОДОМ <i>IN VITRO</i> ТРАНСКРИПЦИИ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ ПОЛУЧЕННОЙ МРНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК A549.....	122
Должикова О. А., Семиколенова О. А., Мещанинова М. И., Новопашина Д. С. АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ CRISPR/CAS9 СИСТЕМЫ НА УРОВНЕ РНК.....	124
Дорохин А. С., Липайкин С. Ю. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУРФАКТАНТОВ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) И ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА).....	126
Дудаев А. Е., Рыльцева Г. А. РАССАСЫВАЮЩИЕСЯ НЕТКАНЫЕ НАНОМЕМБРАНЫ ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА-СО-4-ГИДРОКСИБУТИРАТА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	128
Егоров А. Н., Воронов И. В., Троев И. П., Готовцев Р. А. АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ <i>PHLOJODICARPUS SIBIRICUS</i>	130
Жеремян Э. А., Устюгова А. С., Карамушка Н. М., Стасевич Е. М., Уварова А. Н., Корнеев К. В., Купраш Д. В. СПОСОБ <i>EX VIVO</i> ИНДУКЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ С ВЫРАЖЕННЫМИ ИММУНОСУПРЕССИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ.....	132
Журавлев А. М., Аксенов В. В., Гаврилюк В. Н., Голованов А. Б., Иванов И. В. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ALOX15 НА ОСНОВЕ ЛИГАНДОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РАЗНОНАПРАВЛЕННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ЛИНОЛЕВОЙ И АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТ.....	134
Задорожный А. М., Шарабрин С. В., Рудомётов А. П., Карпенко Л. И. ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-МАТРИЦЫ ДЛЯ НАРАБОТКИ МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ RVD БЕЛКА S ВИРУСА SARS-COV-2 OMICRON BA.2.....	136
Зенкова А. К., Акино А. Д., Бочкарева М. Д., Корнаков И. А., Гречко Д. А., Попова А. С., Воронкова К. А., Хасаншина З. Р. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК <i>E. COLI</i> ВО ВРЕМЯ ФЕРМЕНТАЦИИ.....	138

Зиганшина Э. Э., Зиганшин А. М. БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НЕФТЕПРОМЫСЛОВЫХ ВОД РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН	140
Зиганшина Э. Э., Булынина С. С., Зиганшин А. М. ПРОДУКТИВНОСТЬ ХЛОРЕЛЛЫ ПРИ РОСТЕ НА СТОКАХ БЫТОВЫХ ВОД	142
Зимонина А. А., Прудникова Е. Ю., Иматдинов А. Р. РЕКОМБИНАНТНЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ SARS-COV-2 ВАРИАНТОВ DELTA И OMICRON	144
Змиевская Е. А., Мухаметшин С. А., Сираева Е. Т., Кутырева М. П., Ханнанов А. А., Булатов Э. Р. ИСКУССТВЕННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ Т-КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ ИНДУКЦИИ	146
Ионов Я. А., Шабалкин И. Д., Назарова Е. А. МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ $ZnFe_2O_4@MnFe_2O_4$ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЛИПАЗЫ	148
Кадисон К. В., Быков А. Г., Арляпов В. А., Решетиллов А. Н. ВЛИЯНИЕ МАТРИЦЫ ПЭДОТ:ПСС-БСА НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК И ИХ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ	149
Казакова А. В., Ищук С. А. ПРИМЕНЕНИЕ ПОДХОДА «ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА» ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ СЕБЕСТОИМОСТИ АФС	151
Казиева А. Ю. РАЗМНОЖЕНИЕ ЛАПЧАТКИ КУСТАРНИКОВОЙ МЕТОДОМ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ	153
Карелина К. В., Баядин Р. Б., Терновой В. А. ПОЛУЧЕНИЕ ФРАГМЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО КЛЕЩЕВОГО ЗАЩИТНОГО АНТИГЕНА СЕРПИНА IPIS-1, ДОМЕНА RCL-ПЕТЛИ, КЛЕЩЕЙ <i>IXODES PERSULCATUS</i>	155
Клементьев С. В., Куликова Ю. В., Сироткин А. С. СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК НА ВОДНОЙ ФАЗЕ ПРОЦЕССА ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО ОЖИЖЕНИЯ БИОМАССЫ АКТИВНОГО ИЛА	158
Комарова Н. В., Панова О. С., Титов А. А. ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-АПТАМЕРА К КАРДИОМАРКЕРУ КОПЕПТИНУ	160
Константинова С. В., Бокша И. С., Лунин В. Г., Данилова Т. А., Попонова М. С., Лящук А. М., Галушкина З. М., Устенко Е. В. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СТРЕПТОКОККОВ	162
Кополева Е. А., Пельтек А. РАЗРАБОТКА РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ТРИТИОЦИАНУРОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	164
Кривошеина Е. И., Карташов М. Ю., Чуб Е. В. РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ	166
Кулешов Д. О., Громов И. А., Дьяченко А. А. ПРОТОТИП МИКРОКАПЕЛЬНОГО ХИМИЧЕСКОГО РЕАКТОРА	168
Куликов В. В., Щербаков Д. Н., Волкова Н. В. РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА АРМИРОВАННОЙ РНК	170
Кулябин В. А., Скорьнина А. В., Шадрин А. М. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ЭНДОЛИЗИНА PLY57 И ПОЛИ-ГАММА-D-ГЛУТАМАТ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ ENVD	171
Курашова С., Егорова М., Ветрова А., Теодорович Р., Ишмухаметов А., Ткаченко Е., Дзагурова Т. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АДЬЮВАНТОВ В СОСТАВЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХАНТАВИРУСНОЙ ВАКЦИНЫ	173
Ле-Дейген И. М., Мамаева П. В., Сафронова А. С., Скуредина А. А., Колмогоров И. М., Кудряшова Е. В. ХИМИЧЕСКИЙ ДИЗАЙН СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ЛИПИДНО-ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ НА ПРИМЕРЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И АНТИФИБРОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	175
Лепикаш Р. В., Лаврова Д. Г. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ <i>PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS</i> ВКМ В-2188D И РАСТЕНИЯ <i>LEMNA MINOR</i>	177
Литвинова В. Р., Рудомётов А. П., Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Задорожный А. М., Рудомётова Н. Б., Фандо А. А., Тигеева Е. В., Яковлев В. А., Иванова К. И., Марченко В. Ю., Ильичева Т. Н., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А. ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА ПОДТИПА А/Н5N8	179

Лямина С. В., Калиш С. В. ВЛИЯНИЕ ГЕНА SP-D НА СИНТЕЗ HSP70 В РЕПРОГРАММИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ	181
Марченко Д. М., Божоккин М. С., Михайлова Е. Р., Сопова Ю. В., Хотин М. Г. АКТИВАЦИЯ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА.....	183
Маслов Р. Д., Балабова Д. В., Колосов П. В., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕКОМБИНАНТОЙ TAQ-ПОЛИМЕРАЗЫ В СИСТЕМЕ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	185
Меркульева Ю. А., Колосова Е. А., Щербаков Д. Н. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВЕКТОР PBSU ОБЕСПЕЧИВАЕТ ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ФОСФОЛИПАЗЫ <i>S. V. THURINGIENSIS</i> В КЛЕТКАХ <i>B. MOJAVENSIS</i>	187
Механцева К. В., Васильченко Н. Г., Чистяков В. А. ИЗУЧЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, СОСТАВЛЯЮЩИХ ОСНОВУ БИОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ «CODE OF BALANCE F1», ПОТЕНЦИАЛЬНО СПОСОБНЫХ К ЭФФЕКТИВНОМУ РАЗЛОЖЕНИЮ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ.....	189
Морозова М. Д., Чернышев С. Э., Багиров Р. Т.-о., Бабкина И. Б., Модяева В. П., Скрипцова К. Е., Субботина Е. Ю., Щербаков М. В., Симакова А. В. ПРОЕКТИРОВАНИЕ НУТРИЕНТНОГО СОСТАВА БИОМАССЫ НАЗЕМНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ	191
Неклесова М. В., Диб Н. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ AMUC_1100 И P9 И ОЦЕНКА ИХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ <i>IN VITRO</i>	193
Николаева В. А., Зухайб М., Камалов М. И., Нахметова Ф. М., Хохлачев М. В., Паширова Т. Н., Абдуллин Т. И., Салахиева Д. В. ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ПРООКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ФОРМУЛИРОВКИ МЕНАДИОНА НА ОСНОВЕ ТВЕРДЫХ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ	195
Новокупцев Н. В., Ревин В. В. БИОТЕХНОЛОГИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ШИРОКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДА ЛЕВАНА.....	196
Олейник Г. А., Жданова П. В., Баранова С. В. УСТАНОВЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ЛЕД- СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ИЗ <i>MUOXOSERPHALUS OCTODECEMSPINOSUS</i> МЕТОДАМИ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	198
Парамоник А. П., Тимофеева А. М., Седых С. Е., Невинский Г. А. ЗАГРУЗКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА ЛОШАДИ	200
Парфенова П. С., Михайлова Н. А., Хотин М. Г., Красковская Н. А. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА	201
Патлай А. А., Шмелев М. Е., Силантьев В. Е., Белоусов А. С. СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ С НАСТРАИВАЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	203
Петренко О. А., Самылова О. В., Кузнецова А. А., Щербакова Ю. В., Ахмадуллина Ф. Ю. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТХОДОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ	205
Попова В. К., Дмитриенко Е. В. МАГНИТНЫЕ НАНОГИБРИДЫ СМЕШАННОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА И КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА.....	207
Пушкарев И. А., Мартынов В. А., Куренинова Т. В., Евдокимов И. Ю., Иркитова А. Н. ВЛИЯНИЕ МЕТАБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ТЕЛЯТ	209
Романова А. Д., Лунев Е. А., Бардина М. В. <i>IN VITRO</i> СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ААВ-ВЕКТОРОВ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ.....	212
Рудакова Н. Л., Хиляс И. В., Хасанов Д. И., Шарипова М. Р. АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММА <i>BACILLUS PUMILUS</i> 3-19	214
Рыбалко Д. С., Дрозд В. Д., Патра К., Эльдиб А. А., Жарков Т. Д., Купрюшкин М. С., Колпащиков Д. М. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРИАЗИНИЛАМИДОФОСФАТА ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ АСО И СЛОЖНЫХ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ.....	215
Савенкова Д. А., Алхиреев Д. А., Боднев С. А., Прудникова Е. Ю., Зайковская А. В., Головко Ю. А., Иматдинов И. Р., Рыжиков А. Б., Пьянков О. В., Юдкин Д. В. ТРАНСГЕННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ В ВИРУСОЛОГИИ	217
Самохвалов А. В., Серебренникова К. В., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ АПТАМЕРОВ С КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ГОМОГЕНТНЫХ СИСТЕМАХ С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ	219

Седелникова А. Ю., Дмитриенко Е. В. КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННОГО ПОЛИМЕРА ДЛЯ УЛАВЛИВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО	221
Селиванов П. А. ИММУНОСУПРЕССИЯ КАК НЕБЛАГОПРИЯТНЫЙ ФАКТОР ЛЕТАЛЬНОГО ИСХОДА ПРИ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЕ	223
Сильванович Е. К., Полякова А. А., Шалик И. К., Курченко О. М., Мальшакова Б. А. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛЕНИЯ ...	225
Скрипцова К. Е., Чернышев С. Э., Бабкина И. Б., Багиров Р. Т.-о., Модяева В. П., Морозова М. Д., Субботина Е. Ю., Щербаков М. В., Симакова А. В. НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОЙ ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ВЫРАЩИВАНИЯ НАЗЕМНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ СИБИРИ В УСЛОВИЯХ КФХ.....	227
Снегирева А. А., Прудникова Е. Ю., Ивкина Д. И., Иматдинов И. Р. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО RBD ГЛИКОПРОТЕИНА SPIKE ВИРУСА SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ.....	229
Соловьева М. И., Селищев Д. С., Журавлев Е. С., Степанов Г. А., Рихтер В. А., Козлов Д. В. СПОСОБ ПЕРМАНЕНТНОГО УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТОКАТАЛИЗАТОРОВ	231
Солодков П. П., Беловежец Т. Н., Чикаев А. Н., Баранов К. О., Кулемзин С. В., Горчаков А. А., Гусельников С. В., Мечетина Л. В., Наякшин А. М., Волкова О. Ю., Чикаев Н. А., Таранин А. В. ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ЛАМЫ, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ SARS-COV-2	233
Солонкина А. Д., Сахаров А. А., Чепикова О. Е., Гороховец Н. В., Головин А. В., Замятнин-мл. А. А. ПОИСК НОВЫХ ГЛЮТЕНАЗ ПШЕНИЦЫ <i>TRITICUM AESTIVUM</i> L. И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ	235
Суворова В. В., Нечаева И. А. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ.....	237
Сухова М. М., Красильников И. В., Исаев А. А., Вахрушева А. В., Иванов А. В., Цымбаревич И. В. ПЛАТФОРМА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БЕЗОПАСНЫХ СУБЪЕДИНИЧНЫХ ВАКЦИН.....	239
Тигеева Е. В., Боргоякова М. Б., Рудомётов А. П., Старостина Е. В., Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Задорожный А. М., Яковлев В. А., Кудров Г. А., Шиповалов А. В., Пьянков О. В., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А. ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ИСКУССТВЕННОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНОГЕНА ПРОТИВ COVID-19.....	240
Тимохин К. М., Старченко И. В., Беловежец Л. А. <i>HORMONEMA MACROSPORUM</i> КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОДУЦЕНТ МЕЛАНИНА	243
Томашевич Н. С., Цыгичко А. А. ЭНТОМОПАТОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ГРАНУЛОВИРУСА В ОТНОШЕНИИ <i>CYDIA POMONELLA</i>	245
Троев И. П., Слепцов А. А., Алексеев В. А. НОРМАЛИЗАЦИЯ ОТКЛОНЕННЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ ПРИ ЛАБОРАТОРНОМ ИСПЫТАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЛАЗМОФИЛЬТРА.....	247
Трушлис Э. В., Новосадская А. Е., Лазукин А. А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МТЭ	250
Ушкаленко Н. Д., Ерш А. В., Филатов П. В., Полтавченко А. Г. БЫСТРЫЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСОВ	253
Фандо А. А., Рудомётова Н. Б., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н., Фоменко В. В., Салахутдинов Н. Ф., Карпенко Л. И. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1	255
Фокина А. Д., Миленьева И. С. ИЗУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА <i>CURCUMA LONGA</i> L. КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ	256
Фоменко Н. Г., Жолобова О. О. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА КЛОНОВОГО ПОДВОЯ ВСЛ-2 К КАЛУСОГЕНЕЗУ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	258
Фролова А. С., Миленьева И. С. УСТОЙЧИВОСТЬ КОНСОРЦИУМА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМ МИКРООРГАНИЗМАМ.....	260
Фролова А. С., Колпакова Д. Е., Хорошкина Н. Н., Безъязыкова М. В., Карчин К. В. БАКТЕРИИ-ЭНДОФИТЫ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ	262
Хасанов Д. Г., Назарова Е. А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРЧИ КУРИНОГО МЯСА С ПОМОЩЬЮ СЕНСОРА НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА.....	264

Цмокалюк Д. А., Загорская А. А., Белавин П. А., Уварова Е. А., Дейнеко Е. В. ВЫЯВЛЕНИЕ РАЙОНОВ ИНТЕГРАЦИИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ В ГЕНОМЕ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> , ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ВЫХОДА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА.....	266
Чепурнов Г. Ю., Блинов А. Г., Гончаров Н. П. ВЫЯВЛЕНИЕ НОВОГО АЛЛЕЛЬНОГО ВАРИАНТА ГЕНА <i>VRN-D1</i> У <i>AEGILOPS TAUSCHII</i> COSS.....	268
Черная А. И., Антосюк О. Н., Болотник Е. В. ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА <i>MONARDA CITRIODORA</i> (SERV. EX LAG.) НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	271
Чиркова В. Ю., Щербаков Д. Н., Евдокимов И. Ю. СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С, ПОЛУЧЕННОЙ В СИСТЕМЕ <i>BACILLUS MOJAVENSIS</i> ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПОЛУПРОМЫШЛЕННОМ ФЕРМЕНТЕРЕ.....	273
Шатунова Е. А., Королев М. А., Воробьева М. А. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ СЫВОРОТОЧНОГО БЕЛКА DKK-1 ПРИ СПОНДИЛОАРТРИТАХ	275
Шевченко А. Р., Майорова К. А. БИОКАТАЛИЗ ДРЕВЕСНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕДИЦИНСКОГО И ПИЩЕВОГО НАЗНАЧЕНИЯ	277
Шевченко О. В., Плехова Н. Г., Медков М. А. РАЗРАБОТКА НОВОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНЪЮГАТА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.....	279
Шешукова Е. В., Поздышев Д. В., Круглов И. И., Комарова Т. В. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУКЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО БИОСИМИЛЯРА ПЕРТУЗУМАБА, СИНТЕЗИРУЕМОГО В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ В ВИДЕ ПРОЦЕССИРУЕМОГО ПОЛИПРОТЕИНА.....	281
Шишкин И. Ю., Лапа С. А., Чудинов А. В. ПОДБОР УСЛОВИЙ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ АЛЮМИНИЕВОГО БИОЧИПА.....	283
Штылев Г. Ф., Левашова А. И., Бутвиловская В. И., Чудинов А. В. МЕТОДЫ АКТИВАЦИИ «ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ» ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ МЕТАКРИЛАТА В ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ БИОЧИПОВ.....	285
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. АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ	287
Юрченко А. В., Циммерман Е. Л., Добровольская О. А., Высочинская В. В., Елпаева Е. А. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ <i>IN VITRO</i> ТРАНСКРИПЦИИ мРНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ Т7 РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ПОЛИАДЕНИЛАТ-ПОЛИМЕРАЗЫ	289
Яровиков А. С., Ищук С. А., Шмурак В. И. ПОДХОД НА ОСНОВЕ DOE ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ПОДБОРА СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ДОБАВОК БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ	291

РАЗДЕЛ III. БИОФИЗИКА

Fedotova E. V., Paston S. V., Goroh A. D. INTERACTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN WITH DIVALENT METAL IONS	293
Grigoryan I. V., Spiridonov V. V., Adelyanov A. M., Koksharov Y. A., Potapenkov K. V., Taranov I. V., Khomutov G. V., Yaroslavov A. A. NEW COLLOIDAL SYSTEMS BASED ON BIOMIMETIC POLYCOMPLEXES	295
Ivontsin L. A., Mashkovtseva E. V., Nartsissov Y. R. STRUCTURAL PECULIARITIES OF THE F_0F_1 -ATP SYNTHASE PROTON HALF-CHANNELS IN MEMBRANES WITH DIFFERENT LIPID COMPOSITIONS	296
Mitin D. E., Chubarov A. S. ALBUMIN CONJUGATES AS MULTIMODAL CONTRAST AGENTS FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING AND FLUORESCENCE IMAGING	297
Zalomova L. V., Fesenko Jr. E. E. THE STUDY OF THE SURVIVAL OF HUMAN MICROBIOME INTESTINAL BACTERIA AFTER CRYOPRESERVATION IN LIQUID NITROGEN.....	298
Абашкин В. М., Становая А. И., Шибабиев И. Э., Падня П. Л., Стойков И. И., Щербин Д. Г. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЕНДРИМЕРОВ С МАКРОЦИКЛИЧЕСКИМ ЯДРОМ ДЛЯ ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК.....	300

Абдулкадиева М. М., Литвиненко В. В., Васильева Е. В., Сысолятина Е. В., Ермолаева С. А. СВЯЗЬ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДВИЖНОСТИ <i>L. MONOCYTOGENES</i> С ИНВАЗИЕЙ В КЛЕТКИ НЕР-2.....	302
Адюкина П. И., Каримова Р. Г. ЭФФЕКТЫ ДОНОРА NO НА СОКРАТИМОСТЬ МИОКАРДА МЫШЕЙ С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ	304
Асанбаева Н. Б., Новопашина Д. С., Рогожникова О. Ю., Тормышев В. М., Суханов А. А., Шернюков А. В., Генаев А. М., Ломзов А. А., Кель А., Беннати М., Мейер А., Багрянская Е. Г. СПЕКТРОСКОПИЯ ¹⁹F-ЭЛЕКТРОН-ЯДЕРНОГО ДВОЙНОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ РАССТОЯНИЙ В ДНК-ДУПЛЕКСАХ	306
Бирюков М. М., Полякова А. А., Крячкова Н. В., Горбунова Е. А., Милахина Е. В., Закревский Д. Э., Швейгерт И. В., Коваль О. А. ПЭГ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ И ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ.....	307
Богданова А. С., Павлова Е. Р., Полянская А. Ю., Волкова М. В., Бирюкова Е. С., Дурыманов М. О., Клинов Д. В., Багров Д. В. УСКОРЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ НЕТКАНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА.....	309
Воропаев Г. С., Тимченко Н. А., Егоров А. Е. ВОЗМОЖНОСТИ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ НА МОДЕЛИ БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА ЛЕГКИХ У МЫШЕЙ	311
Гарипова А. И., Каримова Р. Г. ЭФФЕКТЫ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЦА У КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ.....	313
Гифер П. К., Верновская В. И., Батищев О. В. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ NM-ДОМЕНА БЕЛКА M1 ВИРУСА ГРИППА А.....	315
Глухов С. И., Яковлев И. А., Кузнецова Е. А., Мартынова В. В., Гаврилов Ю. К., Коконцев Д. А., Акулиничев С. В. ОБЛУЧЕНИЕ ЯИЦ <i>COTURNIX JAPONICA</i> ПРОТОНАМИ В РЕЖИМЕ FLASH ПОКАЗАЛО ЛУЧШУЮ СОХРАННОСТЬ ЗДОРОВЫХ ТКАНЕЙ И ОРГАНОГЕНЕЗА У ЭМБРИОНОВ	317
Горохова Е. А., Каримова Р. Г. ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС С МОДЕЛЬЮ ШИЗОФРЕНИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА	318
Грабовой А. С., Колесник О. В., Кудряшева Н. С. ИЗУЧЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ Фуллеренола C_{60,70} С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО БИОТЕСТА.....	320
Долотова С. М., Бершацкий Я. В., Загрядская Ю. А., Кузьмичев П. К., Камынина А. В., Павлов К. В., Охрименко И. С., Бочаров Э. В. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ RAGE ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЙ.....	322
Жуйков Д. А., Трифонов С. В. ПОВЫШЕНИЕ СКОРОСТИ РАЗЛОЖЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ В МЕТОДЕ «МОКРОГО» СЖИГАНИЯ.....	324
Загрядская Ю. А., Любайкина Н. А., Храпов С. Е., Долотова С. М., Гавриленкова А. А., Петровская Л. Е., Охрименко И. С. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПРОТЕОРОДОПСИНА БАКТЕРИИ, НАЙДЕННОЙ В АНТАРКТИКЕ.....	327
Захарова А. А., Ефимова С. С., Остроумова О. С. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ АНИДУЛАФУНГИНА ФОРМИРОВАТЬ ПОРЫ В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА	329
Зеньков А. В., Сушко Е. С., Сарангова А. Б., Кудряшева Н. С. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ РАСТВОРОВ СЕЛЕН-СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ, ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ И СИНТЕЗА ЭЛЕМЕНТАРНОГО СЕЛЕНА.....	331
Иванова Д. Н., Котб О. М., Брожик Д. С., Вербенко В. Н., Гулевич Е. П., Ежов В. Ф., Карлин Д. Л., Мурзакова И. Ф., Пак Ф. А., Пастон С. В., Фомин Э. В., Халиков А. И. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ В СТРУКТУРЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК, ВЫЗВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ	334
Ишемгулов А. Т., Легута С. Н., Сенчукова М. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ТКАНЕЙ.....	336
Канарская М. А., Ломзов А. А. УПРАВЛЕНИЕ ФОРМОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОСТЬЮ КОМПЛЕКСОВ РНК, ОБРАЗОВАННЫХ ПАРОЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	338

Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Задорожный А. М., Тигеева Е. В., Яковлев В. А., Рудомётов А. П., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДНК- И МРНК-ВАКЦИН	340
Коваленко С. Г., Фролова Ш. Р., Агладзе К. И. СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КАРДИОПЛЕГИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ НОРМАКОР И КУСТОДИОЛ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ НА СЕРДЦЕ	343
Колесник О. В., Рожко Т. В., Сачкова А. С., Кудряшева Н. С. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТН-232 НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ. РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА	345
Колоколов М. И., Санникова Н. И., Хлынова Т. А., Чубаров А. С., Федин М. В., Крумкачева О. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ G-КВАДРУПЛЕКС-ПОРФИРИН И АЛЬБУМИН-ПОРФИРИН МЕТОДАМИ ЭПР И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ.....	347
Комарова А. Д., Синюшкина С. Д., Можеров А. М., Критченков И. С., Туник С. П., Дружкова И. Н., Щеславский В. И., Ширманова М. В. <i>IN VIVO</i> ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОРОДНОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСОВ ОПУХОЛЕЙ ПРИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ МЕТОДОМ PLIM/FLIM.....	349
Кононова П. А., Селюгина О. Ю., Фоменко В. В., Поляков Н. Э. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ С ТРАНСМЕМБРАННЫМ ДОМЕНОМ Е-БЕЛКА SARS-COV-2 В МОДЕЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ	351
Кравченко С. В. БИОПЕЧАТЬ ГИДРОГЕЛЕМ НА ОСНОВЕ КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ, СОДЕРЖАЩИМ УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ	353
Крылов Д. П., Козлов Д. С., Родимова С. А., Можеров А. М., Карабут М. М., Кузнецова Д. С. ОЦЕНКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МЕТОДАМИ FLIM И ПЦР-РВ В <i>EX VIVO</i> ОБРАЗЦАХ.....	355
Кудряшов Т. А., Шевелева М. П., Немашкалова Е. Л., Дерюшева Е. И. ВЛИЯНИЕ ФИКОЛА70 И ФИКОЛА400 НА ЭНТАЛПИЮ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА АНТИГЕН – АНТИТЕЛО В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И БЕВАЦИЗУМАБА	357
Кулешова Т. Э., Желначева П. В., Синявина Н. Г., Галушко А. С., Панова Г. Г. РАЗРАБОТКА БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЗЕЛеной ЭНЕРГИИ В ПРОЦЕССЕ ВЫРАЩИВАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ.....	359
Кучаев Е. С., Кудрявцев К. В., Клочков В. В., Аганов А. В., Усачев К. С. АНАЛИЗ МЕТОДОМ ЯМР ПЕПТИДА LPRDA – ИНГИБИТОРА СОРТАЗЫ А ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА.....	361
Левковская Г. М., Шамаль Н. В., Тарасевич В. Ф., Боголюбова А. Н., Каспаров А. К. СЭМ-ХАРАКТЕРИСТИКА «КЛАДБИЩ» ТЕРАТОМОРФНЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН, СФОРМИРОВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ВЫСОЧАЙШЕГО РАДИАЦИОННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВЕЛИЗИ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС	362
Литвиненко В. В., Васильева Е. В., Абдулкадиева М. А., Сысолятина Е. В., Ермолаева С. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДВИЖНОСТИ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ	367
Малыгина Н. М., Лянгузов А. Ю., Иванов А. М., Петрова Т. А. СОЗДАЕМ «ПОРТРЕТЫ» БЕЛКОВ МЕТОДАМИ ПРОИЗВОДНОЙ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ (НА ПРИМЕРЕ ГЕМОЦИАНИНА МОЛЛЮСКА <i>ACHATINA FULICA</i> И БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА).....	369
Мысина Е. А., Иванов В. К., Колманович Д. Д., Попов А. Л. НАНОЧАСТИЦЫ $LU_{0,85}GD_{0,15}F_5$ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ТЕРАНОСТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ	371
Навесова Ю. В., Крахалев М. Н., Зотина Т. А. СТРУКТУРНЫЕ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕМАТИКА, ДОПИРОВАННОГО РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПИГМЕНТАМИ.....	372
Нефедова В. В., Кечко О. И., Матюшенко А. М., Левицкий Д. И. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРОПОНИНОВОГО КОМПЛЕКСА И ТРОПОМИОЗИНА	374
Нур Ш. А., Ларионова М. Д., Буракова Л. П., Еремеева Е. В. ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ МЯГКОГО КОРАЛЛА <i>RENILLA MUELLERI</i>.....	376
Овчеренко С. С., Насонов Д. М., Шернюков А. В., Ендуткин А. В., Жарков Д. О., Багрянская Е. Г. ДИНАМИКА ОТКРЫТИЯ ПАР ОСНОВАНИЙ ОХОГ:С И ОХОГ:А ПО ДАННЫМ МЕТОДИКИ ЯМР ПЕРЕНОСА НАМАГНИЧЕННОСТИ С ВОДЫ.....	377

Омельченко А. Н., Окотруб К. А., Суровцев Н. В., Игонина Т. Н., Брусенцев Е. Ю., Амстиславский С. Я. ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА ПРИ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ	379
Осик Н. А., Центалович Ю. П. ИЗУЧЕНИЕ ФОТОЗАЩИТНЫХ БИОМОЛЕКУЛ ХРУСТАЛИКОВ ГЛАЗ ЖИВОТНЫХ.....	381
Парчайкина М. В., Кузьменко Т. П., Попков Е. В., Заварькина А. В., Аржанов Н. Е., Ревин В. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КЛОБЕТАЗОЛА НА ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ	383
Пирогова П. А., Здобнова Т. А., Гринберг М. А., Воденев В. А. АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТРЕССОВЫХ СИГНАЛОВ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ	385
Плеханов А. А., Советский А. А., Логинова М. М., Аветисян Е. А., Шепелева А. А., Шутова А. М., Гамаюнов С. В., Гречканев Г. О., Сироткина М. А., Зайцев В. Ю., Гладкова Н. Д. КОМПРЕССИОННАЯ ОПТИЧЕСКАЯ КОГЕРЕНТНАЯ ЭЛАСТОГРАФИЯ КАК НОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ОЦЕНКИ СТРУКТУРЫ ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ ПО МОДУЛЮ УПРУГОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ	387
Попов Д. Ю., Казаков М. С., Шитикова Е. Ю., Винокуров А. Ю. ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ВЛИЯЕТ НА ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА И НЕЙТРАЛИЗАЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА МИТОХОНДРИЯМИ	389
Прусаков К. А., Сидорова А. Е., Маслакова А. А., Павлова Е. Р., Багров Д. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОЦЕССОВ МАССОПЕРЕНОСА И АДСОРБЦИИ НА АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОСЕНСОРОВ, ОСНОВАННЫХ НА МИКРОПОРИСТЫХ МЕМБРАНАХ.....	391
Пушкаревская А. А., Аралов А. В., Ломзов А. А. ГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОДЕЗКОСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГ АДЕНИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ПО N6-ПОЛОЖЕНИЮ	393
Растрьгина В. А., Казаков А. С., Дерюшева Е. И., Соколов А. С., Пермьякова М. Е., Литус Е. А., Уверский В. Н., Пермьяков Е. А., Пермьяков С. Е. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ S100P И S100A6 С ЧЕТЫРЕХСПИРАЛЬНЫМИ ЦИТОКИНАМИ	395
Ромодин Л. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Зрилова Ю. А. РИБОКСИН (ИНОЗИН) И ХЛОРОФИЛЛИН КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАДИОЗАЩИТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ	398
Рошаль Д. С., Федоренко К. К., Аззаг К., Рошаль С. Б., Багдигян С. АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОПОЛОГИИ РАКОВОГО, ЗДОРОВОГО И НЕПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЭПИТЕЛИЯ.....	400
Садова А. А., Дмитриева Д. А., Сафронова Н. А., Шевцов М. Б., Куркин Т. С., Борщевский В. И., Мишин А. В. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ GPCR С АНТИТЕЛАМИ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ	403
Сачкова Д. А., Ширманова М. В., Юсубалиева Г. М., Изосимова А. В., Можеров А. М., Баклаушев В. П., Южакова Д. В. ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА В КЛЕТКАХ <i>IN VITRO</i> МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПАЦИЕНТА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ГИПОКСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	405
Слотвицкий М. М., Романова С. А., Бережной А. К., Калинин А. И., Цвеляя В. А., Агладзе К. И. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ВОЛН РЕЕНТРИ В НЕОДНОРОДНОЙ АНИЗОТРОПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ПОМОЩИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ПОТТСА	407
Смирных Д. В., Сушко Е. С., Кичеева А. Г., Кудряшева Н. С. ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ КАРКАСОВ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ МАГНЕТИТОМ, НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ ФЕРМЕНТАТИВНУЮ СИСТЕМУ	409
Смоленцев А. А., Снытникова О. А., Колосова Н. Г., Телегина Д. В., Центалович Ю. П. ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛОМА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС OXYS – МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА	411
Сутормин О. С., Немцева Е. В., Тыртышная Е. С., Петрова Ю. Ю., Кратасюк В. А. КИНЕТИКА НАДФ(Н):ФМН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ, В ПРИСУТСТВИИ ГЛИЦЕРИНА И САХАРОЗЫ	413
Трифорова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А. ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА: ДНКЖ С МЕРКАПТОСУКЦИНАТОМ, НИТРОЗОМЕРКАПТОСУКЦИНАТА; И ДОНОРА КАТИОНОВ НИТРОЗОНИЯ, NA- НИТРОПРУССИДА, НА КЛЕТКИ MCF-7	415
Хлынова Т. А., Санникова Н. Э., Крумкачева О. А. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ КАТИОННЫХ ПОРФИРИНОВ С АПТАМЕРОМ AS1411 МЕТОДАМИ ЭПР И ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....	418

Цвеляя В. А., Слотвицкий М. М., Аитова А. А., Романова С. А., Агладзе К. И. ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК СРЕДСТВО ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРОЦЕССОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АРИТМИЙ.....	419
Шутиков А. А., Арзуманян Г. М., Маматкулов К. З., Арынбек Е., Закрытная Д. С. АНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДА АВ (1-42) В ОБЛАСТИ АМИД I МЕТОДОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ	421
Южакова Д. В., Изосимова А. В., Сачкова Д. А., Ванцева О. А., Сажина М. М., Кондратьева А. Р., Можеров А. М., Яшин К. С., Ширманова М. В. ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА ИММУННЫХ КЛЕТОК	423
Юшин И. И., Гольшев В. М., Ломзов А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЗВЕШЕННЫХ ГИСТОГРАММ.....	425

РАЗДЕЛ IV. ВИРУСОЛОГИЯ

Al Allaf L., Chechushkov A., Ushakova T., Morozova V., Tikunova N. INFLUENCE OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO BACTERIOPHAGE ON PHAGE-THERAPY AND ANTI-BACTERIAL IMMUNITY.....	426
Gurtsieva D. T., Egorov A. D., Minskaia E. S., Brovin A. N., Zhuravleva S. V., Tumaev A. V., Karabelsky A. V. RDH12, DELIVERED BY AAV8 AND AAV9 VECTORS, RESTORES RETINOL DEHYDROGENASE FUNCTION <i>IN VITRO</i>	428
Jdeed G., Morozova V., Ushakova T., Kozlova Yu., Tikunov A., Bardasheva A., Tikunova N. STM171, A <i>STENOTROPHOMONAS</i> BACTERIOPHAGE WITH EFFECTS ON ANTIBIOTIC ACTIVITY AGAINST BIOFILM FORMATION	429
Rak A. Ya., Zabrodskaya Ya. A., Gorbunov N. P., Polyakov D. S., Mezhenkaya D. A., Rudenko L. G., Isakova-Sivak I. N. DEVELOPMENT OF A UNIVERSAL DIAGNOSTIC TEST SYSTEM FOR DETERMINING THE TITER OF ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 BY MICRONEUTRALIZATION.....	431
Алешина Ю. А., Орлов А. В., Лукашев А. Н. РЕКОМБИНАЦИЯ И МОДУЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ У РЯДА СЕМЕЙСТВ ВИРУСОВ С (+)РНК ГЕНОМОМ.....	433
Астахова Е. А., Баранов К. О., Зуев Е. В., Потеряев Д. А., Таранин А. В., Филатов А. В. НАЗАЛЬНАЯ ВАКЦИНА САЛНАВАК И СПУТНИК V ИНДУЦИРУЮТ УВЕЛИЧЕНИЕ АВИДНОСТИ СЫВОРОТОК ПРОТИВ RBD ДОМЕНА SARS-COV-2 В ТЕЧЕНИЕ ПОЛУГОДА ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ.....	435
Барышникова В., Турченко Ю., Тучинская К., Беялетдинова И., Бутенко А., Деревенцова А., Игнатъев Г., Ларичев В., Ляпейкова Е., Рогова А., Холодилов И., Шакарян А., Карганова Г. РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СИБИРСКОГО ПОДТИПА КАК КАНДИДАТ В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНА В ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЕ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ ОРТОФЛАВИВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	437
Батюченко А. В., Шишова А. А., Деревенцова А. В. ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ НЕКАНОНИЧЕСКОГО СПЛАЙСИНГА В НЕРЕПЛИКАТИВНОЙ РНК-РЕКОМБИНАЦИИ.....	439
Беляева Е. Д., Файзуллина Д. Р. МИКРОРНК ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ИНГИБИРУЮТ АУТОФАГИЮ.....	440
Блинова Е. А., Кресова У. А., Дзагурова Т. К. ШТАММЫ ВИРУСА ПУУМАЛА, ВЫЗВАВШИЕ ВСПЫШКУ ГЛПС В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2019 Г., БЫЛИ ЗАНЕСЕНЫ ИЗ УДМУРТИИ.....	442
Болдырев Н. Д., Колосова Н. П., Даниленко А. В., Святченко С. В., Онхонова Г. С., Старчевская М. Е., Марченко В. Ю., Рыжиков А. Б. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА И SARS-COV-2 ОТ СЛУЧАЕВ СОВМЕСТНОГО ЗАРАЖЕНИЯ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2022–2023 ГГ.	444
Бондаренко Е. В., Холодилов И. С., Ермолаева Е. А., Литов А. Г., Карганова Г. Г. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ALONGSHAN ГРУППЫ JINGMENVIRUS.....	445
Борисова Н. И., Роев Г. В., Аглетдинов М. Р., Чистякова Н. В., Хафизов К. Ф. СОЗДАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ НОВЫХ ВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИЙ NGS.....	447

Бояринцева А. Ю., Петрова П. А., Коновалова Н. И., Даниленко Д. М., Еропкин М. Ю. ИЗУЧЕНИЕ ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ НЕЙРАМИНИДАЗЫ У СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А (H3N2)	449
Быков Р. О., Итани Т. М., Чалапа В. И., Старикова П. К., Семенов А. В. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА 2022–2023 ГГ.	451
Власов М. Е., Кудряшов Д. А., Колбасова О. Л., Моргунов С. Ю., Пивова Е. Ю., Репин В. И., Севских Т. А., Синдрякова И. П. ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАНДИДАТНОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА КАТАНГА-350 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ	454
Гаврилова Н. В., Высочинская В. В., Елпаева Е. А., Добровольская О. А., Плотникова М. А., Ложков А. А., Циммерман Е. Л., Шалджян А. А., Забродская Я. А. ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ МРНК, КОДИРУЮЩИХ АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА А И К НУКЛЕОПРОТЕИНУ ВИРУСА ГРИППА В <i>IN VITRO</i>	456
Галеева А. Г., Фролов Г. С., Зубринкин Д. А. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА 2 СЕРОТИПА ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	458
Григорян Д. А., Степенко И. Ф., Мацвай А. Д., Шипулин Г. А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПРАЙМЕРНОЙ ПАНЕЛИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	460
Демина Д. С., Бердиева С. Б., Осипов И. Д., Маслов Д. Е., Комиссарова Т. В., Макуха В. В., Томилова Ю. Э., Аглетдинов Э. Ф., Нетёсов С. В. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АДЕНОВИРУСОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ГБУЗ НСО «ДГКБ № 3» Г. НОВОСИБИРСКА С ДИАГНОЗОМ ОРЗ	462
Дубовицкий Н. А., Дерко А. А., Логинова А. М., Хозяинова А. А., Друзьяка О. Р., Шестопалов А. М., Шаршов К. А. ВИРУСНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ: ПЕРВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>SEADORNNAVIRUS</i> В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ	464
Дубровская Э. В., Ивкина Д. И., Иматдинов А. Р. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ- РЕАССОРТАНТ ВИРУСА ГРИППА А, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ФРАГМЕНТ RBD ГЛИКОПРОТЕИНА SPIKE КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2	466
Дыкина Н. В., Рудакова С. Л. УСЛОВИЯ ПАССИРОВАНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ КЛЕТОК РЫБ ЕРС ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ БЕЗ КРИОКОНСЕРВАЦИИ	468
Елфимов К. А., Гашникова М. П., Готфрид Л. Г., Гашникова Н. М. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ВО ВРЕМЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ <i>IN VITRO</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ	470
Забродская Я. А., Гаврилова Н. В., Плотникова М. А., Ложков А. А. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОМ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ЗАРАЖЕННЫМИ И НЕ ЗАРАЖЕННЫМИ ВИРУСОМ ГРИППА КЛЕТКАМИ, НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА	473
Зайнутдинов С. С., Кудров Г. А., Шиповалов А. В., Меркульева Ю. А., Шульгина И. С. ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ВИРУСА СЕНДАЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИНТРАНАЗАЛЬНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ COVID-19	475
Зяблицкая Е. О., Щербаков Д. Н., Ельчанинова С. А., Колосова Е. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ КЛАССА М У ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 К РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕМУ ДОМЕНУ ШИПОВИДНОГО БЕЛКА SARS-COV-2	477
Ивкина Д. И., Иматдинов А. Р., Дубровская Э. В., Иматдинов И. Р. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС, ЭКСПОНИРУЮЩИЙ GP38 ВИРУСА КРЫМ-КОНГО ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ	479
Исаева А. С., Володина С. И., Порозова Н. О., Идота Э. Э., Бабаева Г., Покровский В. С., Малоголовкин А. С. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ МИКСОМЫ, ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА И БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА	481
Кольцов А. Ю., Холод Н. С., Крутько С. А., Белов С. В., Коротин А. В., Рудакова С. В., Сухер М. М., Кольцова Г. С. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУЛЕНТНЫХ И АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ	483

Комина А. К., Аноятбекова А. М. ПАРВОВИРУС СВИНЕЙ 6-ГО ГЕНОТИПА В РОССИИ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА <i>IN VITRO</i>	485
Коняхина Ю. В., Сергеев А. А., Титова К. А., Пьянков С. А., Якубицкий С. Н., Щелкунов С. Н. ПРОТИВООСПЕННАЯ ВАКЦИНАЦИЯ В НИЗКОЙ ДОЗЕ НА МОДЕЛИ МЫШЕЙ.....	487
Кудря К. С., Сергеева М. В., Комиссаров А. Б., Даниленко Д. М. АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАНТОВ ОМИКРОН ХВВ.1 И CL.1 ВИРУСА SARS-COV-2.....	490
Легостаев С. С., Протопопова Е. В., Лутковский Р. Ю., Святченко В. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ КОИНФИЦИРОВАНИЯ SARS-COV-2 С НЕПАТОГЕННЫМ ВАРИАНТОМ ВИРУСА КОКСАКИ А7 (ШТАММ LEV-8) И ЭНТЕРОВИРУСОМ 71.....	493
Назаренко Е. А., Стародубова Е. С. СИНТЕЗИРУЕМЫЙ КЛЕТКАМИ НЕСТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК 1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА АССОЦИИРОВАН С ЭКЗОСОМАМИ И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ СЕКРЕЦИЮ.....	497
Охезин Е. В., Литов А. Г., Карганова Г. Г. УСТОЙЧИВОСТЬ СТРУКТУР ВИРУСНЫХ РНК ФЛАВИПОДОБНЫХ ВИРУСОВ С СЕГМЕНТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ К ХRN1 ЭКЗОНУКЛЕАЗЕ.....	499
Проценко М. А., Филиппова Е. И., Макаревич Е. В., Горбунова И. А., Теплякова Т. В., Мазуркова Н. А. ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ.....	501
Субботина А. О., Мартемьянов В. В., Белоусова И. А. МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ НОВОГО ШТАММА <i>DENDROLIMUS SIBIRICUS</i> CYROVIRUS-1 В АЛЬТЕРНАТИВНОМ ХОЗЯИНЕ.....	503
Табанюхов К. А., Масленникова В. С., Бедарева Е. В., Пыхтина М. Б. ОСНОВНЫЕ ФИТОПАТОГЕННЫЕ ВИРУСЫ КАРТОФЕЛЯ, РАСПРОСТРАНЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ.....	505
Тишин А. Е., Яровая О. И., Ефстифеева С. С., Иматдинов А. Р., Иматдинов И. Р. МИНИГЕНОМНЫЕ И ПСЕВДОТИПИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	507
Тищенко С. А., Соколова А. С., Салахутдинов Н. Ф., Шишкина Л. Н. СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1-АМИНО-7,7-ДИМЕТИЛБИЦИКЛО[2.2.1]ГЕПТАН-2-ОНА И 1,7,7-ТРИМЕТИЛБИЦИКЛО[2.2.1]ГЕПТАН-2-АМИНА В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОРТОПОКСВИРУСОВ.....	509
Филиппова Е. И., Мазуркова Н. А., Кукушкина Т. А. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕХИНОВ И ЛЕЙКОАНТОЦИАНОВ <i>ALCHEMILLA VULGARIS</i> L. В ЭКСПЕРИМЕНТАХ <i>IN VIVO</i>	511
Цыгичко А. А. ВИРУСЫ ГРАНУЛЕЗА ЯБЛОННОЙ ПЛОДОЖОРКИ ИЗ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ФГБНУ ФНЦБЗР, ОБЛАДАЮЩИЕ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	513
Чанышев М. Д., Власенко Н. В., Котов И. А., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г. ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В.....	515
Чернышева А. Е., Короткова И. А., Болгарова Е. В., Маркарян А. Ю. МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 В СВЕРДЛОВСКОЙ И ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТЯХ.....	517
Шульгина И. С., Якубицкий С. Н., Сергеев А. А., Титова К. А., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Карпенко Л. И., Щелкунов С. Н. ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА <i>ATI</i> НА ПАТОГЕННЫЕ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ.....	520
Шульгина И. С., Пьянков С. А., Тюрин В. Ю., Пьянков О. В. РЕТРОСПЕКТИВНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ СЛУЧАЕВ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН, МЕТОДОМ ИММУНОДИАГНОСТИКИ В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ.....	522

РАЗДЕЛ V. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Ace V.D., Patra C., Eldeeb A.A., Kolpashchikov D.M. GENOTYPING OF CANCER-ASSOCIATED KRAS MUTATION BY DEOXYRIBOZYME BASED 4-ARMS DNA MACHINE.....	524
Akhmetova E.A., Sergeeva O.V., Zatsepin T.S. N-ALKYLSULFONYL MODIFICATIONS ARE PERSPECTIVE ANALOGOUS OF PHOSPHOROTHIOATES IN ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AND GUIDE RNAS.....	526

Biriukova O. D., Kononchuk V. V., Chesnokova O. R., Chuzhikov V. V., Kalinina T. S. STUDY OF THE ROLE OF SMOKING-ASSOCIATED GENES IN THE PATHOGENESIS OF LUNG CANCER.....	527
Bushaev A. A., Ateiah M., Rubel M. S., Kolpashchikov D. M. DEVELOPMENT OF FLUORESCENT HYBRIDIZATION PROBES FOR HIGHLY SELECTIVE DETECTION OF DOUBLE STRANDED DNA ANALYTES AT 37 °C.....	529
Golovina L. A., Hussein Z., Eldeeb A. A., Komissarov A. B., Kolpashchikov D. M. MULTICORE DNA-MACHINE BASED ON BINARY DEOXYRIBOZYME FOR AMPLIFICATION-FREE DETECTION OF SARS-COV-2.....	531
Hussein Z., Smirnov V. V., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. ADVANCING DNA AUTOMATION: MIRNAS-REGULATED «NOT-GATE» LOGIC ELEMENTS BASED ON DEOXYRIBOZYME DNA MACHINES	533
Misnik E. V., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. CANCER CELL DEATH INDUCED BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES	535
Moralev A. D., Salomatina O. V., Zenkova M. A., Markov A. V. NEW MARKER GENES OF TUMOR CELL RESISTANCE TO DOXORUBICIN AND THE DEVELOPMENT OF DRUG CANDIDATES FOR ITS THERAPY.....	537
Mosentsova K. I., Toropova A. V., Nour M., Eldeeb A., Kolpashchikov D. M. DEPENDENCE OF THE AFFINITY OF OLIGONUCLEOTIDES ON CHEMICAL MODIFICATIONS AND THE LENGTH OF NUCLEOTIDE SEQUENCES	539
Odarenko K. V., Salomatina O. V., Salakhutdinov N. F., Zenkova M. A., Markov A. V. SEARCH FOR REGULATORY GENES AND SMALL-MOLECULAR INHIBITORS OF THE HIGHLY AGGRESSIVE PHENOTYPE OF GLIOBLASTOMA.....	541
Saeidi A. INTESTINAL MICROBIOME AS A FACTOR IN ACTIVATING THE INFLAMMATORY PROCESS IN THE COLON IN AN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE EXPERIMENTAL MODEL	543
Singatulina A. S., Sukhanova M. V., Lavrik O. I. FACTOR HPF1 REGULATES THE ACTIVITY OF POLY(ADP-RIBOSE)POLYMERASES 1 AND 2 AND THE FORMATION OF POLY(ADP-RIBOSE)-CONTAINING COMPARTMENTS WITH THE PARTICIPATION OF THE RNA-BINDING PROTEIN FUS	545
Snytkov E. V., Kipen V. N., Mikhailova M. E., Sheyko R. I. ANALYSIS OF THE GENOMES OF DOMESTIC PIGS <i>SUS SCROFA DOMESTICUS</i> OF THE DUROC BREED IN ORDER TO IDENTIFY BREED-SPECIFIC SNP	547
Snytkov E. V., Kipen V. N., Mikhailova M. E., Sheyko R. I. DETERMINATION OF BREED-SPECIFIC SNPS OF LANDRACE PIGS USING BIOINFORMATICS AND KASP-GENOTYPING METHODS	549
Абдурахманова М. М., Леонтьева А. А., Юрина А. А., Беловежец Т. Н., Кулемзин С. В., Кулигина Е. В., Рихтер В. А., Нуштаева А. А. ВЛИЯНИЕ IL-15 И TGFβ НА ФЕНОТИП NK-КЛЕТОК В СОСТАВЕ 3D-МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	550
Алексеева Л. А. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	552
Алсаллум А., Шевченко Ю. А., Фишер М. С., Филиппова Ю. Г., Перик Заводский Р. Ю., Перик-Заводская О. Ю., Алрхмун С., Лопатникова Ю. А., Курилин В. В., Вольнец М., Акахори Я., Шикун Х., Силков А. Н., Сенников С. В. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ С TCR-ПОДОБНЫМ CAR-МОДИФИЦИРОВАННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, СПЕЦИФИЧНЫМ К MAGE-A4 <i>IN VITRO</i>	554
Антипина М. И., Чупахин Е. Г., Какоткин В. В., Агапов М. А., Семина Е. В. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПАТОЛОГИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАПРАВЛЕННОГО УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОГО ПРОТЕОЛИЗА БЕЛКОВЫХ МИШЕНЕЙ PROTAS (PROTEOLYSIS TARGETING CHIMERAS).....	556
Апанасевич М. В., Кириленко К. М., Коханенко А. А., Артемов Г. Н., Бурлак В. А., Хайдара М. К., Алексеева С. С. ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИЙ КИШЕЧНИКА, СПЕРМАТЕКИ И ЯИЧНИКА У МАЛЯРИЙНЫХ КОМАРОВ <i>ANOPHELES VEKLEMISHEVI</i> , <i>AN. MESSEAE</i> И <i>AN. DACIAE</i> НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПИТАНИЯ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ.....	558
Аржанова Е. Л. ВЛИЯНИЕ L-ФУКОЗЫ НА НАРУШЕНИЯ МИТРОХОНДРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЗМА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ <i>MUC2^{-/-}</i>	560

Бабошко Д. А., Сивай М. В., Кузьмин А. И., Рожков О. А., Тотменин А. В., Флеер М. В., Гашникова Н. М. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ГЕНОВАРИАНТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ.....	562
Балькова А. Н., Коврижников А. В., Ерошенко Г. А. ГЕНОМНЫЙ ПОРТРЕТ ПОПУЛЯЦИЙ YERSINIA PESTIS ИЗ ОЧАГОВ ЧУМЫ ПРИКАСПИЙСКОГО РЕГИОНА И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ОЧАГОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ	564
Барановская Е. Е., Чубаров А. С., Ломзов А. А., Васильева С. В. ФОСФОРАМИДНЫЕ АЗОЛЬНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ — НОВЫЕ ЭФФЕКТИВНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ.....	566
Бауэр И. А., Жарков Т. Д., Жуков С. А., Купрюшкин М. С., Павлова А. С., Дмитриенко Е. В. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ.....	568
Бахно И. А. ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК.....	570
Бачкова И. К., Жуков С. А., Купрюшкин М. С., Зенкова М. А., Черноловская Е. Л., Черников И. В. ВЛИЯНИЕ МЕЗИЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ SIRNK <i>IN VITRO</i>.....	571
Башарова К. С., Безрукова А. И., Григорьева Е. В., Байдакова Г. В., Павлова С. В., Милохина И. В., Медведев С. П., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н., Усенко Т. С. ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЛИЗОСОМНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 В КЛЕТЧНЫХ ЛИНИЯХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ <i>GBA1</i>	573
Безрукова А. И., Башарова К. С., Милохина И. В., Пчелина С. Н., Усенко Т. С. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АУТОФАГИИ У ПАЦИЕНТОВ С <i>GBA</i>-АССОЦИИРОВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ <i>GBA1</i>	575
Бирулина Ю. Г., Иванов В. В., Буйко Е. Е., Воронкова О. В., Чернышов Н. А., Геращенко Т. С. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ МАКРОФАГОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ.....	577
Богатова К. С., Яковлева О. В. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ АЛЛОДИНИИ, СВЕТОБОЯЗНИ И ТРЕВОЖНОСТИ У КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ НИТРОГЛИЦЕРИНА	579
Болдинова Е. О., Барановский А. Г., Филина Ю. В., Мифтахова Р. Р., Манукян А. А., Тагиров Т., Макарова А. В. РОЛЬ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА В МЕХАНИЗМЕ АКТИВНОСТИ ПРАЙМАЗЫ-ПОЛИМЕРАЗЫ PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА	581
Булгаков Т. К., Шебардина Н. Г., Зерний Е. Ю., Вологжанникова А. А., Шевелева М. П., Бакшеева В. Е. НЕЙРОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЦИНКА ПРИ ГЛАУКОМЕ: РОЛЬ ФАКТОРА ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ	583
Булыгин А. С., Фишер М. С., Курилин В. В., Хантакова Ю. Н., Сенников С. В. ИНДУКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ НА АЛЛОАНТИГЕНЫ ТРАНСПЛАНТАТА В МОДЕЛИ КОЖНОГО ЛОСКУТА С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ИНГИБИТОРА ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ КИНАЗ 8/19.....	585
Валембахов И. С., Бирюкова О. Д., Конончук В. В., Калинина Т. С. ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ МИКРОРНК, ЭКСПРЕССИЯ КОТОРЫХ РЕГУЛИРУЕТСЯ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ, В ОБРАЗЦАХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО	587
Вечкапова С. О., Проскура А. Л. ВКЛАД ЛЕПТИНА И ИНСУЛИНА В РЕГУЛЯЦИЮ ПЛОТНОСТИ СИНАПТИЧЕСКИХ АМПА-РЕЦЕПТОРОВ ГИППОКАМПА	589
Высочинская В. В., Забродская Я. А., Довбыш О. В., Егорова М. А., Маслов М. А. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОНИКАЮЩЕГО В КЛЕТКУ ПЕПТИДА И ПЕГИЛИРОВАННЫХ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК НА <i>IN VITRO</i> МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА	591
Гавриленкова А. А., Деев И. Е., Бочаров Э. В., Охрименко И. С., Серова О. В. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА (IGF-IR) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА	593
Гаптулбарова К. А., Невская К. В., Цыденова Д. С., Долгашева Д. С., Першина А. Г., Литвяков Н. В. ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	594

Гилева М. С., Уфимцева Е. Г., Гуляева Л. Ф., Козлов В. В. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ МЕТОДОМ <i>EX VIVO</i>	596
Головенчик В. И., Гайдученко Е. С., Липинская Т. П. МОЛЕКУЛЯРНО-ВИДОВАЯ ДИАГНОСТИКА ТРУДНОДИФФЕРЕНЦИРУЕМЫХ ВИДОВ РОДА ТУПОНОСЫЕ БЫЧКИ: РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР-ПДРФ КЛЮЧЕЙ	598
Гуринович А. С., Титок М. А. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ RAR-PHR ПЛАЗМИДЫ PVS72 БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	601
Данилин Н. А., Матвеев А. Л., Бардашева А. В., Гольшев В. М., Новопашина Д. С. ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ ИНГИБИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНУЮ РНКАЗУ Р ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ: СИНТЕЗ И СВОЙСТВА	603
Демченко А. Г., Белова Л. Л., Баясин М. В., Кондрагьева Е. В., Лавров А. В., Смирнихина С. А. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БАЗАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ.....	605
Дерягина Е. В., Макарова К. А. ВЛИЯНИЕ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ И ТРИТОНА X-100 НА АКТИВНОСТЬ NA,K-АТФАЗЫ СМЕШАННОЙ МЕМБРАННОЙ ФРАКЦИИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС.....	607
Долгашева Д. С., Кравцова Е. А., Цыденова И. А., Гаптулбарова К. А., Невская К. В., Першина А. Г., Литвяков Н. В. ВЛИЯНИЕ КОЛИЧЕСТВА АМПЛИФИКАЦИЙ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА УРОВЕНЬ ИХ ЭКСПРЕССИИ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ОПУХОЛЕЙ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	609
Домнин П. А., Кононихин А. С., Парфенов В. А., Ермолаева С. А., Хесуани Ю. Д. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ НЕВЕСОМОСТИ И МАГНИТНОЙ ЛЕВИТАЦИИ НА ПРОТЕОМ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	612
Дорошенко В. О., Гончаров Н. В. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДОСТАВКИ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ NIF1-A В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-87 MG	614
Драчева К. В., Побожьева И. А., Анисимова К. А., Хамид З. М., Баландов С. Г., Василевский Д. И., Пчелина С. Н., Мирошникова В. В. МИКРОРНК ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЫВОРОТКИ КРОВИ КАК МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА ПРИ ОЖИРЕНИИ	616
Дрозд В. С., Рыбалко Д. С., Салимова А. А., Колпацников Д. М., Эльдиб А. А. АКТИВАЦИЯ БИНАРНЫМИ АНТИСМЫСЛОВЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ ДЕГРАДАЦИИ МРНК-МИШЕНИ С ПОМОЩЬЮ KRAS ТРАНСКРИПТА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562	618
Дронова Т. А., Бабьшкіна Н. Н., Слонимская Е. М., Чердынцева Н. В. ОЦЕНКА РИСКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАЮЩИХ ТАМОКСИФЕН.....	620
Жильникова М. В., Троицкая О. С., Новак Д. Д., Нуштаева А. А., Коваль О. А. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ	622
Заволока Е. Л., Воронцова Ю. Е., Черезов Р. О., Симонова О. Б. ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ НОКДАУН ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ГЕНОВ <i>LAWC</i> И <i>TRF2</i> В СОМАТИЧЕСКИХ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ТКАНЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	624
Захарченко А. Е., Домнин П. А., Ермолаева С. А. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АВТОАГРЕГАЦИИ ЭНТЕРОПАТОГЕННОЙ <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ, ОСНОВАННОЙ НА МАГНИТНОЙ ЛЕВИТАЦИИ.....	626
Зотова Л., Жумалин А., Гаджимурадова А., Жирнова И., Абдуллоев Ф., Нуралов А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОВ ПОЛУКАРЛИКОВОСТИ RHT (-B1A, -B1B, D1A, D1B) И КРУПНОЗЕРНОСТИ TAGW8-B1A, TAGS5-3A ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ	628
Ильичева Е. Ю., Магазенкова Д. Н., Рекина В. Е., Джассим З. М., Фаррух М., Пучкова Л. В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИОНОВ СЕРЕБРА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	631
Исакова Ж. Т., Чекиров К. Б., Кипень В. Н. ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ <i>BOS GRUNNIENS</i> И <i>BOS TAURUS</i> НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>CEP112 (CCDC46)</i>.....	633
Казиахмедова С. А., Глазова О. В., Волчков П. Ю. ВЫЯВЛЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ РАЗЛИЧИЙ В КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ МУТАЦИИ ГЕНА <i>CYP21A1</i>	635

Капитонова М. А., Шабалина А. В., Дедков В. Г., Долгова А. С. РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА <i>GUANARITO</i> НА ОСНОВЕ CRISPR-CAS12A С ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ В ОДНОЙ ПРОБИРКЕ	640
Кириченко А. Д., Брюшкова Е. А., Долгова А. С., Дедков В. Г. НОВЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК-СОДЕРЖАЩЕГО МАММАРЕНАВИРУСА <i>SABIA</i>.....	643
Кисакова Л. А., Кисаков Д. Н., Яковлев В. А., Тигеева Е. В., Боргоякова М. Б., Макарова К. П., Рудомётов А. П., Карпенко Л. И. СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИНОЙ <i>PVAXRBD</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТРУЙНОЙ ИНЪЕКЦИИ.....	646
Кислова А. В., Жегло Д., Пожитнова В. О., Свиридов Ф. С., Гаджиева Э. П., Воронина Е. С. СТРЕСС РЕПЛИКАЦИИ ВЫЗЫВАЕТ ЗАДЕРЖКУ ВСТУПЛЕНИЯ В МИТОЗ И ЛОМКОСТЬ ХРОМОСОМЫ 12 В ДЛИННОМ НЕЙРОНАЛЬНОМ ГЕНЕ <i>ANKS1B</i> В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА	648
Кичкина Д. О., Патрушев С. С., Моралев А. Д., Шульц Э. Э., Зенкова М. А., Марков А. В. НОВЫЕ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫЕ ЛАКТОНЫ КАК ИНДУКТОРЫ ОКСИЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ И БЛОКАТОРЫ АГРЕССИВНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ	650
Коваленко А. В., Булыгина Е. А., Сенина А. М., Синягина М. Н., Хуснутдинова Д. Р., Маркелова М. И., Абдулхаков С. Р., Григорьева Т. В. ИЗМЕНЕНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ КУРЕНИЯ СИГАРЕТ И ОТКАЗА ОТ НЕГО.....	652
Козлов Д. С., Родимова С. А., Крылов Д. П., Можеров А. М., Зюзин М. В., Кузнецова Д. С. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ В <i>EX VIVO</i> ТКАНЕВЫХ СРЕЗАХ ПЕЧЕНИ	654
Колегова Е. С., Кононова Л. А., Федорова И. К., Кульбакин Д. Е., Жалсанова И. Ж., Сивцев А. А., Скрябин Н. А., Денисов Е. В. МИКРОБИОТА РАКА ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА И ЕЕ ЗНАЧЕНИЕ В ПРОГНОЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ	656
Комлева П. Д., Арефьева А. Б., Синякова Н. А., Куликов А. В. ПОЛИМОРФИЗМ <i>C1473G</i> В ГЕНЕ <i>TRH2</i> МЫШИ СНИЖАЕТ СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТА ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ 2.....	658
Кондратьева Л. Г., Кузьмич А. И., Линге И. А., Дидыч Д. А., Алексеенко И. В. ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ БЦЖ.....	659
Корнилов Ф. Д., Ананьев Е. А., Васильева Е. В., Минеев К. С., Гончарук С. А., Гончарук М. В. КО-ТРАНСЛЯЦИОННОЕ ВСТРАИВАНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ПРИ БЕСКЛЕТОЧНОМ СИНТЕЗЕ	661
Кравцова Е. А., Цыденова И. А., Долгашева Д. С., Гаптулбарова К. А., Литвяков Н. В., Ибрагимов М. К. ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛАНДШАФТА ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНТРАЦИКЛИН-СОДЕРЖАЩИХ СХЕМ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ.....	662
Крячкова Н. В., Полякова А. А., Бирюков М. М., Милахина Е. В., Закревский Д. Э., Швейгерт И. В., Коваль О. А. ЦИТОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА.....	664
Куваева Е. Е., Мерцалов И. Б., Симонова О. Б. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИЙ ГЕНА <i>TOOTHTRIN</i>	666
Кудрякова И. В., Афошин А. С., Тарлачков С. В., Леонтьевская Е. А., Галемина И. Е., Зеленов Д. В., Леонтьевская Н. В. ОТ ОМИКС-ТЕХНОЛОГИЙ ДО ВЫДЕЛЕНИЯ НОВОГО БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА <i>AMI LYSOBACTER CAPSICI XL1</i>, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.....	668
Куликова Д. Б., Носова В. О., Тищенко А. А. ОСОБЕННОСТИ ГЛУТАТИОНОВОЙ РЕДОКС-СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ	670
Куприянова Е. А., Абдулхаков С. Р., Маркелова М. И., Григорьева Т. В. МЕТАТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ЖЕЛУДКА У БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ	672
Лаушкина В. О., Шакирова А. И., Комарова Я. В., Муслимов А. Р., Онопченко А. В., Щелина Е. В., Острова С. А., Васютина М. Г., Лепик К. В. ОЦЕНКА УРОВНЯ ДОНОРСКОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ CD34+ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЫШАМ ЛИНИИ NBSGW МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР	674

Леонтьева А. А., Абдурахманова М. М., Юрина А. А., Кулемзин С. В., Рихтер В. А., Кулигина Е. В., Нуштаева А. А. АКТИВНОСТЬ НК-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ОТНОШЕНИИ ГЕТЕРОТИПИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ 3D-МОДЕЛЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	676
Липатова Е. А., Штаут М. И., Соловова О. А., Сорокина Т. М., Казарян М. С., Щагина О. А., Поляков А. В., Черных В. Б. МИКРОДЕЛЕЦИИ Y-ХРОМОСОМЫ С ЗАХВАТОМ РЕГИОНА AZFB У РОССИЙСКИХ МУЖЧИН С БЕСПЛОДИЕМ	678
Меламуд М. М., Ермаков Е. А., Брит П. И., Журавлёв Е. С., Балахонова Е. А., Степанов Г. А., Камаева Д. А., Иванова С. А., Невинский Г. А., Бунева В. Н. СВЯЗЬ МЕЖДУ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ПОПЫТКАМИ САМОУБИЙСТВА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ	680
Михайлова Е. Е., Байков И. К., Тикунова Н. В. МОДИФИКАЦИЯ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ПОМОЩЬЮ НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ БЕЛКОВ	682
Молоков А. Ю., Гервас П. А., Чердынцева Н. В. ПОИСК НОВЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК ТУВИНСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ С ПОМОЩЬЮ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕВЕНИРОВАНИЯ	684
Моторина Д. М., Баттулина Н. В. РЕПРЕССИЯ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ БЕЛКА DCAS12 НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	686
Никитин А. О., Тимофеева А. М., Седых С. Е., Невинский Г. А. АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ В ГИДРОЛИЗЕ МИКРОРНК: РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ	688
Никольский К. С., Куликова Л. И., Петровский Д. В., Руднев В. Р., Кайшева А. Л. ИССЛЕДОВАНИЕ АВТОНОМНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СТРУКТУРНОГО МОТИВА 3α-ПУЧОК.....	690
Отряскин Я. С., Юртова А. В., Пиняев С. И. РЕЦЕПТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ КЛЕТКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕГЕНЕРАЦИИ ТРАВМИРОВАННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ.....	692
Охальников А. Д., Моторина А. О., Гавриш М. С., Бабаев А. А. ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АРХИТЕКТУРЫ В АСТРОЦИТАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕМЕРА <i>IN VITRO</i>.....	694
Павлова Н. С., Цабай П. Н., Батырова З. К., Кумыкова З. Х., Большакова А. С., Уварова Е. В., Трофимов Д. Ю. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ И МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛА (НФП) У НОВОРОЖДЕННЫХ И ПОДРОСТКОВ	696
Петренко В. С., Врублевская В. В., Жмурина М. А., Скарга Ю. Ю., Моренков О. С. АДАПТАЦИЯ ШАПЕРОННОЙ МАШИНЫ КЛЕТОК ФИБРОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА HT1080 К ПОТЕРЕ HSP90A В РЕЗУЛЬТАТЕ НОКАУТА ГЕНА <i>HSP90AA1</i>	698
Петров Г. О., Муханов В. С., Дымова М. А. СОЗДАНИЕ ТАРГЕТНЫХ ГИБРИДНЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГА M13 ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ТРАНСДУКЦИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА.....	701
Пеунов Д. А., Телегина Д. В., Кожевникова О. С., Колосова Н. Г. АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕМАТОРЕТИНАЛЬНОГО И ГИППОКАМПАЛЬНОГО ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРОВ У КРЫС <i>OXYS</i> ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ И БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА	703
Поляков С. А., Кузнецова В. Е., Лебедев Т. Д., Шершов В. Е., Чудинов А. В. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ TWEEN-20 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДНК-АПТАМЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ CELL SELEX К РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЕ C-KIT.....	705
Потешкина К. И., Стенкова А. М. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ И ПОЛИКЕТИДОВ	707
Потысьева А. С., Арсениев А. Н., Селькова П. А., Васильева А. А., Мельников А. С., Сердобинцев П. Ю., Ходорковский М. А. СРАВНЕНИЕ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОРТОЛОГОВ CRISPR CAS12A ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ.....	709
Прокопенко Е. С., Надей О. В., Агалакова Н. И. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ NMDA И AMPA РЕЦЕПТОРОВ В ДОРСАЛЬНОМ ГИППОКАМПЕ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП В ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМ СОСТОЯНИИ	710
Простакишина Е. А., Патышева М. Р., Колегова Е. С., Хозяинова А. А., Меняйло М. Е., Ларионова И. В., Федорова И. К., Кульбакин Д. Е., Чойнзонов Е. Л., Денисов Е. В. ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ЛАНДШАФТА РАКА ЯЗЫКА У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ	712
Рузанова В. С. ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕХНОЛОГИИ «КАРАНАХАН» И <i>IN SITU</i> ВАКЦИНАЦИИ, ОБЪЕДИНЕННЫХ В ОДИН ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ РЕЖИМ.....	714

Савин И. А., Марков А. В., Зенкова М. А., Сенькова А. В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ НА ФОНЕ ВОСПАЛЕНИЯ, НА МОДЕЛИ DSS-ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО КОЛИТА И КОЛИТ-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА	716
Самарина С. А., Цыбко А. С., Науменко В. С., Ильчибаева Т. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ 5-НТ ₇ -TRKB ГЕТЕРОКОМПЛЕКСОВ <i>IN VITRO</i>	718
Самусева П. Д., Мехова А. А. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ У <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> В ТЕЧЕНИЕ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА.....	720
Санникова А. В., Шарипова М. Р., Шакиров Е. В., Валеева Л. Р. РОЛЬ TRFL-БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР <i>MARCHANTIA POLYMORPHA</i>	722
Сафарова П. В., Чаленко Я. М., Федорова В. А., Захарченко А. Е., Ермолаева С. А. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНВАЗИИ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> В КЛЕТКИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ЗАВИСИТ ОТ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ ИЗОФОРМ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ INLA И INLB	724
Сафронова Н. А., Куркин Т. С., Шевцов М. Б., Садова А. А., Загрядская Ю. А., Охрименко И. С., Борщевский В. И., Мишин А. В. ПОДГОТОВКА РЕЦЕПТОРА, АССОЦИИРОВАННОГО С ПАТОГЕНЕЗОМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА, ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	726
Саченко А. Б., Шур В. В., Диченко Я. В., Усанов С. А., Янцевич А. В. ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ <i>V. BOVIS</i> И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА <i>E. COLI</i>	728
Скотникова А. К., Адонина С. Н., Москалюк В. С., Куликова Е. А., Базовкина Д. В. ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА <i>TNF</i> НА ПОВЕДЕНИЕ, ЭКСПРЕССИЮ BDNF И СЕРТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ДЕКСАМЕТАЗОНА ...	730
Соболева О. А., Торгунакова А. В., Минина В. И. ДЛИНА ТЕЛОМЕР У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО	731
Соловьева А. И., Пономарева А. А., Рыкова Е. Ю., Тарасова А. А., Костромицкий Д. Н., Добродеев А. Ю., Афанасьев С. А., Чердынцева Н. В. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ПРЯМОЙ КИШКИ	734
Степаненко Е. А., Герасимова Т. П., Бондарева Н. Е., Шеремет А. Б., Федина Е. Д., Тихомиров А. Д., Макарова И. В., Зигангирова Н. А., Тарантул В. З., Ненашева В. В. РОЛЬ БЕЛКА TRIM14 В ИММУННОМ ОТВЕТЕ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ИНФЕКЦИЮ, ВЫЗВАННУЮ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> , У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ.....	736
Ступак Е. В., Ступак В. В., Глотов В. М., Князькова А. И., Самарина А. А., Вражнов Д. А., Черкасова О. П. МЕТОД РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В МАЛОИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГЛИОМ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ.....	739
Сухинина Е. В., Козлова П. К., Невская К. В., Литвяков Н. В., Першина А. Г. ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>MUS</i> НА МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК ЛИНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	741
Уварова А. Н., Ткаченко Е. А., Корнеев К. В., Купраш Д. В. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ SNP, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАСПОЛОЖЕННЫХ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНОВ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА	743
Уткина А. А., Кудрявцева А. А., Манухов И. В. СВЕРХЭКСПРЕССИЯ СЛОЖНОЭКСПРЕССИРУЕМЫХ БЕЛКОВ АНТИРЕСТРИКЦИИ ARDA И ARDB В ТЕРМОИНДУЦИБЕЛЬНОМ ВЕКТОРЕ PIR-DPAL.....	745
Фефилова Е. А., Шувалов О. Ю. ВЛИЯНИЕ УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ MDM2 НА ФЕРМЕНТЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ НМРЛ ЧЕЛОВЕКА	747
Филатов П. В., Горбенко Д. А., Березовская М. Ю. ОПТИМИЗАЦИЯ КОНСТРУКЦИИ ДНК-НАНОМАШИНЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ 16S РРНК <i>STARHYLOCOCCLUS AUREUS</i>	748
Филатова А. А., Алексеева Л. А., Миронова Н. Л. ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК НА ИНВАЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЛАНОМЫ МЫШИ.....	750
Фишер М. С., Бульгин А. С., Курилин В. В., Хантакова Ю. Н., Сенников С. В. ИНДУКЦИЯ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ КОЛЛАГЕН-ИНДУЦИРОВАННОМ АРТРИТЕ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ <i>IN VITRO</i>	752

Фролова А. А., Патышева М. Р., Федоров А. А., Вострикова М. А., Брагина О. Д., Коробейников В. Ю., Геращенко Т. С., Чердынцева Н. В. ПРОФИЛИРОВАНИЕ ИММУННЫХ КЛЕТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ХИМИОТЕРАПИИ.....	754
Хайретдинова А. Р., Михайлина А. О., Леконцева Н. В., Марченков В. В., Никонов О. С., Балобанов В. А. СТАБИЛИЗАЦИЯ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ АПИКАЛЬНОГО ДОМЕНА GROEL SM-ПОДОБНЫМ БЕЛКОМ ИЗ <i>SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS</i>	756
Хасанов Д. И., Рудакова Н. Л., Васильева Ю. А., Гильмутдинова А. И., Ласточкина Е. Э., Волкова Е. С., Шарипова М. Р. СОЗДАНИЕ CRISPR/CAS9 ВЕКТОРА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ АДАМАЛИЗИНОПОДОБНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ГЕНОМЕ <i>BACILLUS PUMILUS</i> 3-19.....	758
Холошенко И. В., Гондаренко Е. А., Шелухина И. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК СУБЪЕДИНИЦ ГЕТЕРОМЕРНЫХ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МАКРОФАГАХ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ЛИГАНДОВ.....	760
Цабай П. Н., Павлова Н. С., Кумыкова З. Х., Батырова З. К., Большакова А. С., Уварова Е. В., Трофимов Д. Ю. ВЫСОКАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ С ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ЯИЧНИКОВ.....	761
Цишевская А. А., Тюрин В. Ю., Тишин А. Е., Иматдинов И. Р., Гладышева А. В. СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ НОВЫХ ОРТОНАЙРОВИРУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛИХОРАДКОЙ У ЛЮДЕЙ.....	763
Цыденова И. А., Маркович В. А., Кравцова Е. А., Долгашева Д. С., Цыганов М. М., Литвяков Н. В. КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА IV СТАДИИ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ГЕНОВ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ	765
Чепикова О. Е., Петушкова А. И., Родионов И. В., Гороховец Н. В., Замятнин-мл. А. А., Савватеева Л. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИСТЕИНОВЫХ КАТЕПСИНОВ С ПЕПТИДНЫМИ ИНГИБИТОРАМИ.....	767
Чумачёва Ю. В., Сташкевич Д. С. КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ SNPS TNFRSF11B И TNFA У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ БАШКИРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ.....	769
Шарабрин С. В., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Красникова С. И., Гудымо А. С., Иванова К. И., Марченко В. Ю., Ильичева Т. Н., Рудомётов А. П., Ильичёв А. А., Карпенко Л. И. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МРНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА H1N1	772
Шахова Е. С., Мышкина Н. М., Загитова Р. И., Котлобай А. А., Морозов В. В., Балакирева А. В., Ямпольский И. В., Осипова З. М. ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЛЮЦИФЕРАЗЫ ИЗ ДИНОФИТОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ <i>PYROCYSTIS LUNULA</i> В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ.....	774
Шефер А. А., Яньшолё Л. В., Григорьева А. Е., Тамкович С. Н. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ БЕЛКОВ ЭКЗОСОМ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, И ПОИСК БЕЛКОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ «ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ»	775
Шокина В. А., Доронин С. А., Кудрявцев А. В. РАЗРАБОТКА НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ НАНОТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19.....	776
Шутко Е. В., Саллум Г., Брызгунова О. Е., Мурина Е. А., Остальцев И. А., Пак С. В., Лактионов П. П., Коношенко М. Ю. МИКРОРНК ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МОЧИ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	778
Яковлев В. А., Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Тигеева Е. В., Боргоякова М. Б., Зайковская А. В., Шиповалов А. В., Кудров Г. А., Пьянков О. В., Рудомётов А. П., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А. ОЦЕНКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ДНК-ВАКЦИНЫ PVAHRVD НА МОДЕЛИ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C, ИММУНИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОМ СТРУЙНОЙ ИНЪЕКЦИИ	780
Ямских А. А., Ильина Е. С., Дырхеева Н. С., Медведев С. П., Малахова А. А., Закиян С. М., Ходырева С. Н., Лаврик О. И. СОЗДАНИЕ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА СО СНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СУБЪЕДИНИЦ KU-АНТИГЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9.....	782
Указатель авторов.....	784

Научное издание

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

Сборник тезисов

Ответственная за выпуск *П. И. Юрганова*
Корректоры *О. Э. Вульф, Н. А. Егина, Н. А. Ермакова, П. И. Юрганова*
Верстка *А. С. Терешкиной*
Обложка *Е. В. Неклюдовой*

Подписано к опубликованию 01.10.2023 г.
Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 101,75. Усл. печ. л. 94,6.
Заказ № 228.

Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.



OPENBIO — 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 БИОИНФОРМАТИКОВ,
БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ, ВИРУСОЛОГОВ
И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ**



ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ



**ВЫСТАВКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ**



**НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ:
ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА МИКРОМИРА**

ISBN 978-5-4437-1526-1



9 785443 715261



OPENBIO.RU

LIFESCIENCE EVENT