

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

Площадка открытых коммуникаций OpenBio – это комплекс мероприятий, посвященных рождению и коммерциализации научных идей в сфере биотехнологии:



МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ



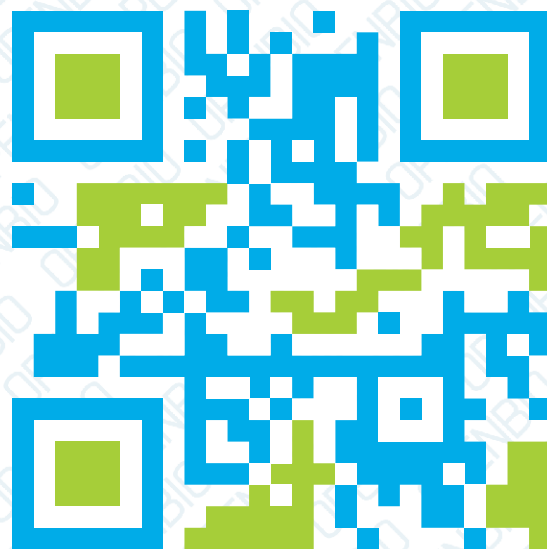
ПРЕЗЕНТАЦИЯ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАУКИ И БИЗНЕСА В РАЗРЕЗЕ РЕГИОНА / СТРАНЫ / МИРА



ДИСКУССИОННАЯ ПЛОЩАДКА ИНСТИТУТОВ РАЗВИТИЯ И ИНФРАСТРУКТУРЫ ПОДДЕРЖКИ ИННОВАЦИОННОГО БИЗНЕСА



БИОТЕХ ВНЕ ФОРМАТА: НАУКА БЕЗ ОФИЦИОЗА ДЛЯ КАЖДОГО ИЗ НЕБЕЗРАЗЛИЧНЫХ



www.openbio.ru

ISBN 978-5-4437-0297-1



9 785443 702971



KOLTSOVO/2014

OPEN
BIO

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO
МЕРОПРИЯТИЕ ГОДА НАУКИ РОССИЯ-ЕС

СБОРНИК

ТЕЗИСОВ

I МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ:
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО – 2014



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»



ИННОВАЦИОННЫЙ
ЦЕНТР КОЛЬЦОВО

**I Международная конференция
молодых ученых: биотехнологов,
молекулярных биологов
и вирусологов**

Сборник тезисов

Новосибирск
2014

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

Научная конференция проводится при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований.
Грант № 14-34-10174 мол_г.

I Международная конференция молодых ученых: биотехнологов,
М431 молекулярных биологов и вирусологов : Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т.
Новосибирск : РИЦ НГУ, 2014. 155 с.

ISBN 978-5-4437-0297-1

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в Оргкомитет Международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2014.

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

Тезисы публикуются в авторской редакции.

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

ISBN 978-5-4437-0297-1

© ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», 2014
© АНО «Инновационный центр Кольцово», 2014

В. Ю. Земко, В. К. Окулич

*Витебский государственный медицинский университет
г. Витебск, Беларусь*

АНАЛИЗ ПЕПТИДОГЛИКАН-РАЗРУШАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНЫМ ОТИТОМ

Большинство антимикробных пептидов (АМП) представлено катионными, гранулы-ассоциированными пептидами с аффинностью к компонентам микробной клеточной стенки, например пептидогликану. В клинической лабораторной практике определение уровней АМП может быть полезно в качестве маркеров системной активации нейтрофилов, при мониторинге течения инфекционных и воспалительных заболеваний [1].

Ключевые слова: ферментативная активность, пептидогликан.

Цель: оценить способность сыворотки разрушать пептидогликан у пациентов с острым и хроническим гнойным отитом.

Материалы и методы исследования. Для исследования было взято 18 сывороток больных из оториноларингологического отделения и 18 сывороток доноров, находившихся на лечении в Витебской областной клинической больнице. Пациенты были распределены на 2 группы: 10 человек с острым гнойным отитом, 8 – с хроническим гнойным отитом. В качестве контрольной группы были взяты лица призывного возраста, находившиеся на плановом обследовании в кардиологическом отделении ВОКБ.

Пробы перед применением осаждали в течение 10 минут (10 тыс об/мин; центрифуга MICRO 120). Для постановки метода использовали пептидогликан, меченый 2%-ым Конго красным (ПМК), сыворотку больного и 0,2 М солянокислый трис-буфер pH 7,4 так как у нейтрофильной эластазы оптимум pH.

В один ряд эппендорфов вносили последовательно: 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови. Во второй ряд эппендорфов – 300 мкл раствора ПМК и 100 мкл сыворотки крови, которую предварительно нагревали в течение часа при температуре 56°C для инактивации компонента. Контролем служили пробы, содержащие трис-HCl буфер pH 7,4 в количестве 300 мкл и 100 мкл сыворотки крови.

Далее проводили инкубацию проб в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Затем пробы извлекали из термостата и центрифугировали в течение 10 минут (10 тыс об/мин; MICRO 120) для осаждения оставшегося неразрушенного ПМК. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и

переносили в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм определяли оптическую плотность в лунках.

Результат выражался в оптических единицах и рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета полученных результатов в пикокаталы нами была использована формула, выведенная после построения калибровочного графика по разведенному Конго красному, в котором была отражена зависимость активности фермента от оптической плотности раствора, исходя из того, что при расщеплении 1 молекулы субстрата, в раствор переходит 1 молекула Конго красного.

$$Y = [-0,00117 + 0,0346 \times E_{\text{оп}}] \times 9,92$$

Где Y – искомый результат;

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Так как анализ распределения данных показал их непараметрическое распределение, статистическую обработку проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова, отличия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. В результате исследования было установлено, что уровень активности ферментов, способных разрушать ПГ у пациентов с гнойно-воспалительной патологией оказался достоверно выше (Медиана=0,112 пкат), чем у доноров (Медиана=0,087 пкат, $p < 0,05$). После инактивации комплемента способность разрушать ПГ достоверно снижается (Медиана=0,076 пкат, $p < 0,05$).

Выводы.

1. Разработана методика, позволяющая определить антимикробную активность сыворотки крови пациентов разрушать пептидогликан.
2. Получены достоверные различия в ферментативной активности сыворотки крови по ее способности разрушать пептидогликан между пациентами с гнойным отитом и донорами.
3. Установлено статистически значимое снижение способности сыворотки разрушать пептидогликан после инактивации комплемента.

Список литературы

1. Катионные антимикробные пептиды системы неспецифической защиты: дефензины и кателицидины. Дефензины – молекулы, переживающие ренессанс (часть 3). URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/26053> (дата доступа: 21.02.2014)
2. Алешина, Г. М., Кокряков, В. Н., Шамова, О. В., Орлов, Д. С. и др. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных

факторах иммунитета // Медицинский академический журнал. 2010. № 4. С. 149–160.

3. Будихина А. С., Пинегин Б. В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008. №2. С. 31–40.

Д. С. Кульханова, А. А. Эрст, Т. И. Новикова

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РЕДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ Р. *FRITILLARIA* *

Лекарственные растения представляют большой интерес в области биотехнологии. Методы *in vitro*, с помощью которых раскрывается морфогенетический потенциал живых клеток растений, могут быть использованы в промышленных процессах, в сельском хозяйстве, лесоводстве, садоводстве и медицине. При использовании тканевых культур могут быть решены различные проблемы в области биотехнологии растений, такие как микроразмножение, биосинтез и биотрансформация биологически активных соединений, генная инженерия высших растений, а также хранение растительных клеток и органов (Вајај, 1986). При этом большинство научных исследований, объектом которых являются лекарственные растения, связаны с производством и биотрансформацией фармакологически активных веществ в культуре тканей (Butcher 1977; Staba 1977, 1980, 1985; Heinstei 1985). Разработка и применение технологии микроразмножения лекарственных растений имеет важное значение для сохранения, массового размножения и изучения свойств ценных лекарственных растений (Zhou, Wu, 2006).

Представители рода *Fritillaria* (Liliaceae) широко используются в традиционной медицине. Растения обладают следующими лекарственными свойствами: противокашлевое, муколитическое, отхаркивающее. Они также применяются при воспалительных отеках горла и легких (Li et al., 2001, Wagner et al., 2011).

Целью нашего исследования было введение в культуру и разработка технологий микроразмножения лекарственных растений *Fritillaria meleagris* L., *F. ruthenica* Wikstr., *F. dagana* Turcz. ex Trautv.

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили чашки луковичных чешуй 5*5 мм, которые стерилизовали 70% этанолом (30 сек), затем 0,1% HgCl₂ с добавлением 1% Tween 80 (30 мин). Далее

* Работа выполнена при поддержке грантов ОПТЭК, «У.М.Н.И.К.».

растительный материал трехкратно промывали в стерильной дистиллированной воде. Основными питательными средами явились среда по прописи Данстена и Шорта (BDS), а также среда по прописи Гамборга (B5), дополненные регуляторами роста: БАП, ТДЗ, НУК, ИУК в концентрациях от 0,4 до 5,0 мкМ. Морфологическое развитие растений изучали на постоянных микроскопических препаратах, подготовленных по методике З.П. Паушевой (1986).

Применяемый режим стерилизации оказался эффективным и позволил получить 93-96% стерильных эксплантов. Экспериментально установлено, что для микроразмножения растений *F. ruthenica* и *F. dagana* наиболее оптимально внесение в питательную среду цитокинина в низкой концентрации (0,5 мкМ ТДЗ), позволяющее получить в среднем 3,5 побега на эксплант. Наиболее активные процессы регенерации в культуре ткани *F. meleagris* наблюдались при добавлении в питательную среду БАП 0,44 мкМ + НУК 3,22 мкМ + ИУК 2,28 мкМ, что приводило к образованию 4,5 побегов на эксплант.

В работе по изучению морфогенеза использовали сегменты чешуй микролуковичек *F. dagana* из культуры тканей. Фиксировать растительный материал для последующего морфо-гистологического исследования начинали через 7-10 дней культивирования на питательной среде с периодичностью 3-5 дней. Проведенный анализ развития позволил установить, что для растений *F. dagana* в культуре *in vitro* характерно адвентивное побегообразование без промежуточной каллусной стадии. Меристематическая активность начинается спустя 10 дней культивирования в эпидермальных и субэпидермальных тканях экспланта.

Таким образом, нами установлено, что использование луковичных чешуй в качестве первичного экспланта является эффективным, а разработанные протоколы могут быть использованы как для сохранения, так и для массового размножения редких лекарственных растений р. *Fritillaria*.

Список литературы

Bajaj Y.P.S., Gill M.S. (1986) Micropropagation and germplasm preservation of cotton (*Gossypium* spp.) through shoot tip and meristem culture. *Indian J. Exp. Biol.* 24:581–583.

Butcher D.N. (1977) Secondary products in tissue cultures. In: Reinert J., Bajaj Y.P.S. (eds) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 668–693.

Heinstein P.F. (1985) Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 48:1–9.

Li S.L., Lin G., Chan S.W., Li P. (2001) Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid

chromatography coupled with evaporative light scattering detection, J. Chromatogr. A 909(2), 207–214.

Staba E.J. (1977) Tissue culture and pharmacy. In: Reinert J., Bajaj Y.P.S. (eds) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 694–716.

Zhou L.G., Wu J.Y. (2006) Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. Natural product reports. 23: 789–810.

О. В. Сенько^{1,2}, **Н. А. Степанов**^{1,2}
Ф. Мамедова², **О. В. Маслова**²

¹ *Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН,*

² *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

БИОМАССА МАКРОВОДОРОСЛЕЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СУБСТРАТ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ *

В настоящее время биомасса морских растений широко используется в пищевой и фармацевтической промышленности во всем мире. Однако, отходы производства после переработки и извлечения ценных продуктов не нашли широкого коммерческого применения. Также пока невостребованными оказались и штормовые выбросы макроводорослей, поскольку они представляют собой смесь различных видов морских растений, трудно поддающуюся сортировке и переработке в одном процессе, хотя они приходят в негодность и разлагаются с накоплением их на побережье, что ухудшает экологию прибрежных зон.

Однако, такие виды сырья могут найти применение в различных биотехнологических процессах как источник для получения органических кислот, являющихся в настоящее время, ценными мономерами для производства биоразлагаемых полимерных композиций.

В работе была продемонстрирована возможность эффективного использования самых различных видов макроводорослей для получения молочной, фумаровой и янтарной кислот. При этом последнюю можно получать как прямой конверсией сахаров, так и путем биотрансформации фумаровой кислоты.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 3 «Энергетические аспекты глубокой переработки ископаемого и возобновляемого углеродсодержащего сырья».

Поскольку питательные среды, полученные на основе морских растений, содержат соли в значительных концентрациях, а также другие токсичные для клеток микроорганизмов вещества, то эффективнее использовать иммобилизованные клетки продуцентов целевых продуктов. Помимо этого иммобилизованные клетки характеризуются технологической привлекательностью: возможностью многократного использования в течение длительного времени, легкостью отделения микроорганизмов от среды культивирования.

В качестве продуцентов молочной и фумаровой кислоты были выбраны мицелиальные грибы *Rhizopus oryzae*, для получения янтарной кислоты – бактерии *Actinobacillus succinogenes*. На основе выбранных микроорганизмов были получены высоко эффективные биокатализаторы в виде иммобилизованных в криогель поливинилового спирта клеток мицелиальных грибов и бактерий.

В качестве субстратов использовались представители бурых водорослей *Laminaria saccharina*, красных – *Acanthophora muscoides* и зеленых – *Ulva lactuca*. Установлено, что максимальные выходы молочной и фумаровой кислот были получены при использовании в качестве субстрата биомассы Ламинарии (до 86%), а максимальный выход янтарной кислоты – при использовании биомассы красных водорослей (до 89%). При этом необходимо отметить, что мицелиальные грибы – продуценты органических кислот – демонстрировали свой большой потенциал в плане гидролиза указанных видов сырья, секретировав в среды собственные ферменты, способные катализировать разложение основных компонентов биомассы морских растений.

**Н. А. Степанов^{1,2}, О. В. Сенько^{1,2}
О. В. Маслова², Е. Н. Ефременко^{1,2}**

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН,

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ В ПРОЦЕССАХ ПОЛУЧЕНИЯ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ *

В настоящее время перед мировым сообществом стоит целый ряд фундаментальных научных задач, направленных на разработку каталитических систем, обеспечивающих глубокую переработку различных типов

* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 3 «Энергетические аспекты глубокой переработки ископаемого и возобновляемого углеродсодержащего сырья».

возобновляемого углеродсодержащего сырья, представляющих собой отход различных отраслей промышленности и сельского хозяйства. Одной из основных задач этого плана является трансформация различных отходов в коммерчески значимые продукты для целей химической, нефтехимической и топливной промышленности в результате новых каталитических процессов.

Дрожжи, как продуценты ценных метаболитов, отличаются высокими скоростями накопления продуктов и повышенной устойчивостью к негативным факторам (высоким концентрациям накапливающихся продуктов и токсичных компонентов среды, кислым значениям pH).

Кроме традиционного применения дрожжей в качестве продуцентов кормового белка и биоэтанола, в настоящее время активно развивается направление их использования как продуцентов органических кислот, необходимых для синтеза биополимеров, в частности янтарной и яблочной.

Янтарная кислота является полупродуктом для синтеза целого ряда конечных продуктов. Сегодня мировой рынок янтарной кислоты составляет около 400 млн \$ в основном за счет конверсии ее в 1,4-бутандиол, который широко используется для получения различных биоразлагаемых полимерных композиций.

Известно, что клетки дрожжей родов *Yarrowia* и *Candida* могут осуществлять синтез янтарной кислоты, но в низких концентрациях. В качестве способа интенсификации этого процесса в данной работе использовалась иммобилизация отобранных продуцентов.

В работе продемонстрирована возможность эффективного применения биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток дрожжей *Candida utilis* Y15 и *Yarrowia lipolytica* Y34 в процессах трансформации различных видов непищевого возобновляемого сырья: отходов сельского хозяйства (багассы, кукурузных стеблей, пшеничной соломы), деревообрабатывающей промышленности (опилок хвойных и лиственных пород), биомассы микроводорослей и цианобактерий, а также морских растений в янтарную кислоту (с выходом до 78 % от теоретически возможного уровня).

**Л. В. Шулаева, Е. А. Нечаева
Т. А. Зайнутдинов, Д. В. Куликов**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»
shulaeva_lv@vector.nsc.ru*

ВАЛИДАЦИЯ КОМПЬЮТЕРИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ В ПРОИЗВОДСТВЕ КОРЕВОЙ ВАКЦИНЫ В УСЛОВИЯХ GMP

Актуальность. Валидация компьютеризированных систем – это документированное подтверждение соответствия системы действующим требованиям нормативной документации.

Валидация компьютеризированных систем необходима для автоматизации, управления технологическим процессом и повышения качества продукции. Валидации подлежат компьютеризированные системы, связанные с процессом и контролем производства. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» при производстве вакцины коревой культуральной живой сухой используется ряд современного оборудования с системой компьютерного управления, которую необходимо валидировать.

Целью исследования стало изучение технологического подхода проведения валидации компьютеризированных систем.

Материалы и методы. Для процесса проведения валидации компьютеризированных систем были разработаны: валидационный мастер план, стандартные операционные процедуры по резервному копированию и восстановлению данных; по управлению доступом к компьютеризированным системам; по управлению изменениями в компьютеризированных системах. Согласно требованиям GAMP (Good Automated Manufacturing Practice – Надлежащая практика автоматизированных систем), Правилам организации производства и контроля качества лекарственных средств. Приказ Министерства промышленности № 916 от 14.06.2013 (Приложение 11 – Компьютеризованные системы) была проведена оценка критичности компьютеризированных систем, участвующих в производстве вакцины коревой культуральной живой сухой, разработан перечень компьютеризированных систем подлежащих валидации и план валидации.

Результаты. Пакет организационных документов для проведения валидации компьютеризированных систем подготовлен и проведена оценка самих компьютеризированных систем. Идет разработка спецификаций URS (User Requirement Specifications – спецификация требований пользователя), FS (Functional Specifications – функциональная спецификация), TS (Technical Specifications – Техническая спецификация).

Выводы. В результате проведенных исследований установлено, что технологический подход проведения валидации компьютеризированных

систем изучен и усвоен, необходимая документация разработана и утверждена для проведения этапов валидации компьютеризированных систем DQ (Design Qualification – квалификация проектной документации), IQ (Installation Qualification – квалификация монтажа), OQ (Operational Qualification – квалификация функционирования), PQ (Performance Qualification – квалификация эксплуатации). Разработанные документы по валидации компьютеризированных систем могут быть использованы для валидации любой компьютеризированной системы, применяемой в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

А. О. Тихонова, А. А. Тойменцева, М. Р. Шарипова

*Казанский (Приволжский) федеральный университет –
Институт фундаментальной медицины и биологии
Tihonovaao93@gmail.com*

ПОДБОР СИГНАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ СЕКРЕЦИИ БАЦИЛЛЯРНЫХ ПРОТЕИНАЗ

Биотехнология является ключевой отраслью современной промышленности. Получение рекомбинантных белков имеет важное значение, а поиск и оптимизация фермент – продуцирующих штаммов является одной из задач современной биотехнологии.

В данной работе для получения препаративного количества белка была применена LIKE-система экспрессии, которая показала высокий уровень экспрессии на модельных белках Gfp и lacZ. Для оптимизации LIKE-системы экспрессии был применен подход с использованием сигнальных пептидов. Сигнальные последовательности белков YngK, Asp и Pac*Bacillus megaterium* показали высокий уровень экспрессии на внеклеточной гидролазе (Tfh) *Thermobifidafusca* (до 7.7 мг/л¹). В качестве модельных белков были использованы сериновые протеиназы *B. pumilus* 3–19 – субтилизиноподобная протеиназа (AprBp) и глутамилэндопептидаза (GseBp). Для оценки нативных сигнальных последовательностей сериновых протеиназ *insilico* использовали компьютерный алгоритм PrediSi. Программа позволяет выявить в геноме потенциальные сигнальные пептиды и оценить их эффективность. Была оценена эффективность сигнальных пептидов сериновых протеиназ AprBp и GseBp *B. pumilus*, индекс эффективности секреции которых составил – 0,6 и 0,67 соответственно.

Проанализировав литературные данные были подобраны три оптимальных сигнальных пептида *B. megaterium*, которые показали высокий уровень секреции рекомбинантной внеклеточной гидролазы

Thermobifidafusca – в 6 раз выше по сравнению с собственным сигнальным пептидом. Индекс эффективности данных рекомбинантных сигнальных пептидов составил – 0,7 для SP_{pac}, 0,99 для SP_{Yngk} и 0,81 для SP_{Asp}. Использование алгоритма PrediSi позволило оценить перспективность секретиции целевого белка под контролем различных сигнальных пептидов.

Деградация протеазами является одним из лимитирующих факторов в промышленном получении белков. Разработанные конструкции в сочетании с беспротеазными штаммами *B. subtilis* позволят увеличить выход белков для производства промышленно – важных ферментов.

**А. А. Ястребова, А. И. Бураковский
Т. А. Карпенко, М. Н. Тишкевич**

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
лаборатория медицинского микроанализа*

ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АУТОАНТИТЕЛ К ДЕКАРБОКСИЛАЗЕ ГЛЮТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-го ТИПА

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – это группа метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся хронической гипергликемией, которая является результатом нарушения секреции инсулина вследствие деструкции β-клеток поджелудочной железы. Хроническая гипергликемия при СД1 сопровождается повреждением, дисфункцией и недостаточностью различных органов, особенно глаз, почек, нервов, сердца и кровеносных сосудов. К сожалению, в большинстве случаев СД1 диагностируется в клинической стадии, когда уже разрушено 80–90 % β-клеток поджелудочной железы, что увеличивает риск развития тяжелых осложнений.

Поэтому проблема идентификации и количественной детекции АТ-ДГК с высоким уровнем чувствительности и специфичности приобретает особую актуальность.

В рамках Государственной программы «Импортозамещающая фарм-продукция», подпрограммы «Диагностикумы» нами была разработана технология и сконструирована тест-система по определению одного из перспективных маркеров ранней диагностики СД1 – аутоантител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты (АТ-ДГК) – в формате непрямого иммуноферментного анализа. АТ-ДГК могут быть обнаружены за 5-7 лет до клинических проявлений СД1, которые возникают только после гибели не менее 80% инсулинсекретирующих клеток. В связи с этим АТ-ДГК могут

быть успешно использованы для идентификации начальных стадий диабета и выявления индивидуумов с высоким риском развития СД1.

Принцип разработанного метода иммуноферментного анализа для определения концентрации АТ-ДГК в сыворотке крови человека заключается в следующем: с синтетическим пептидом – декарбоксилазой глютаминовой кислоты, предварительно иммобилизованной в лунках микропланшета, связываются АТ-ДГК, находящиеся в анализируемых образцах (исследуемых сыворотках крови, калибровочных и контрольной пробах) с образованием иммунокомплекса. Несвязавшиеся компоненты удаляются путем промывки планшета. На втором этапе к иммунокомплексу «антиген-антитело» добавляют меченные ферментом (пероксидазой хрена) антивидовые поликлональные антитела, специфичные к IgG человека. Индикатором в этом тесте является хромогенный субстрат фермента пероксидазы – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Добавлением стоп-раствора (4,8% H_2SO_4) останавливают развитие цветной реакции и спектрофотометрически (450 нм) измеряют ее интенсивность, которая прямо пропорциональна концентрации АТ-ДГК в исследуемом образце. Для оценки содержания АТ-ДГК в анализируемом образце используется калибровочный график, отражающий зависимость величины оптической плотности анализируемого раствора от концентрации АТ-ДГК.

Набор реагентов по определению АТ-ДГК в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа («ИФА-АТ-ДГК») прошел исследования на модельных экспериментах с известными концентрациями АТ-ДГК в исследуемых образцах. Для всех испытанных проб показана возможность надежного обнаружения исследуемого аналита. В ходе предварительных медицинских испытаний набор реагентов «ИФА-АТ-ДГК» был апробирован на сыворотках крови 180 лиц, разделенных на следующие группы: контрольная ($n=48$), с хроническим аутоиммунным тиреоидитом ($n=34$), с СД1 ($n=81$), с сахарным диабетом 2 типа ($n=17$). Результат считали положительным при концентрации АТ-ДГК в образце выше 1,0 МЕ/мл, а ниже 1,0 МЕ/мл – отрицательным. Средняя концентрация АТ-ДГК среди больных СД1 составила $4,8 \pm 0,6$ МЕ/мл, что практически в 10 раз выше по сравнению с контрольной группой ($0,5 \pm 0,1$ МЕ/мл). Обнаружена зависимость концентраций АТ-ДГК от степени выраженности аутоиммунного синдрома: уровень АТ-ДГК при продолжительности заболевания до 1 года составил $1,3 \pm 0,2$ МЕ/мл; от 3 до 5 лет – $6,1 \pm 0,7$ МЕ/мл; свыше 7 лет – $8,7 \pm 0,9$ МЕ/мл. В группе образцов сывороток крови пациентов с хроническим аутоиммунным тиреоидитом среднее значение АТ-ДГК составило $2,9 \pm 0,7$ МЕ/мл (АТ-ДГК выступает в роли одного из цитологических маркеров имеющего место аутоиммунного процесса). В группе с сахарным диабетом 2 типа среднее значение АТ-ДГК – $1,0 \pm 0,7$ МЕ/мл (увеличение

титра АТ-ДГК имеет важное прогностическое значение в отношении начинающегося формироваться механизма инсулинонедостаточности).

В данный момент набор реагентов ИФА-АТ-ДГК находится на стадии приемочных медицинских испытаний и утверждения эксплуатационной и научно-технической документации.

Определение концентрации АТ-ДГК в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа позволит: диагностировать доклинические стадии СД1; оценивать и контролировать степень выраженности патологического процесса, эффективность проводимой терапии и прогнозировать развитие заболевания; дифференцировать СД1 от сахарного диабета 2 типа; проводить скрининг родственников (недиабетиков); выявлять группы риска в отношении СД1; а также проводить скрининг женщин с гестационным синдромом с целью оценки риска патологии беременных.

Л. С. Адаменко ¹, А. И. Астанин ²

¹ ЗАО «БиоОйл»

² Новосибирский государственный университет

ДЕГРАДАЦИЯ ФЕНАНТРЕНА ШТАММОМ *PSEUDOMONAS DENITRIFICANS* В ПРИСУТСТВИИ И В ОТСУТСТВИИ ДЕТЕРГЕНТА TWEEN-20

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются одними из самых распространенных и опасных органических поллютантов. Эти соединения токсичны и канцерогенны, поэтому представляют опасность как для человека, так и для окружающей среды в целом. Поиск эффективных и доступных способов удаления ПАУ из окружающей среды является актуальной на данный момент задачей. Наиболее перспективным методом очистки является биodeградация, основанная на способности микроорганизмов использовать поллютанты в качестве пищевых субстратов. Фактором, лимитирующим эффективность биodeградации ПАУ, является их крайне низкая растворимость в воде. Для преодоления этого препятствия используются различные детергенты. Однако сами детергенты могут оказывать негативное влияние на биodeградацию ПАУ. Они могут быть токсичны для клеток, являться более предпочтительными пищевыми субстратами, ингибировать деградацию за счёт затруднения проникновения субстрата в клетку. Поэтому влияние детергента на биodeградацию требует отдельного рассмотрения.

Целью данной работы было выделение и характеристика нового штамма деструктора фенантрена, изучение скорости его деградации в жидкой среде, изучение влияния детергента Tween-20 на деградацию фенантрена.

Штамм *Pseudomonas dentitrificans* был выделен из нефтезагрязненной почвы Ямало-Ненецкого автономного округа. Видовая принадлежность определена двумя независимыми методами – секвенированием 16S субъединицы рРНК и определением фенотипических характеристик штамма. Клетки представляют собой Грам-отрицательные подвижные палочки с размером $0,4-0,5 \times 1,5-2,5$ мкм, неспороносные, не формирующие эндоспор, оксидазо и каталазоположительные. По четырем признакам патогенности – гемолитической, плазмокоагулязной, фибринолитической и желатиназной активности штамм показал отрицательный результат.

При инкубировании клеток штамма Fdl с фенантrenom в качестве единственного источника углерода происходит снижение концентрации фенантрена, появление в среде метаболитов и накопление биомассы, что свидетельствует о том, что штамм способен использовать фенантрен в качестве пищевого субстрата. Изменение концентрации фенантрена в процессе инкубации изучали с помощью ВЭЖХ-УФ. Показано, что за 40 часов инкубации концентрация фенантрена снижается от 100 мг/л до 1 мг/л.

Добавка в среду неионного сурфактанта Tween-20 ускоряет деградацию фенантрена и увеличивает количество биомассы. С Tween-20 снижение концентрации фенантрена до значения 1 мг/л достигается за 24 часа, при этом снижение концентрации фенантрена фиксируется уже после 2 часов культивирования.

Деградация фенантрена происходит через образование 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, значительное количество которой было выявлено в среде. Однако накопления этого потенциально токсичного продукта в среде в процессе деградации не происходит – после 24 часов культивирования её концентрация начинает снижаться.

Таким образом, нами был получен новый эффективный деструктор фенантрена, который может осуществлять его деградацию в присутствии детергента, не является патогенным, в процессе деградации не продуцирует потенциально токсичных продуктов. Данный микроорганизм может быть использован для разработки препарата для очистки почв от фенантренового заражения.

**Е. Г. Богомолова, И. В. Духовлинов
Е. А. Фёдорова, А. С. Симбирцев**

*Государственный научно-исследовательский институт
особо чистых биопрепаратов ФМБА России*

СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ VP6 И VP8 РОТАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА ГРУППЫ А И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ

Ротавирусная инфекция является основной причиной возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у младенцев и детей младшего возраста. Ежегодно данное заболевание уносит жизни порядка 500000 человек, особенно в развивающихся странах. В России число регистрируемых случаев ротавирусного гастроэнтерита постоянно растет, что объясняется как увеличением случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания.

Профилактика возникновения тяжелой формы ротавирусной инфекции является актуальным вопросом современной медицины. Большинство детей инфицируется ротавирусами до достижения 5-летнего возраста, что объясняется высокой вирулентностью возбудителя. Вследствие отсутствия препаратов с прямым противоротавирусным действием, лечение ротавирусной инфекции сводится лишь к минимизации последствий дегидратации, развитие которой для детского организма может быть критическим. В настоящее время в мире лицензированы две профилактическое противоротавирусные живые вакцины – Rotarix (GSK, Бельгия) и RotaTeq (Merck, США). В России рекомендована к применению лишь вакцина RotaTeq. Постлицензионные исследования вакцинации младенцев из группы риска в Европе показали хорошие результаты, однако регистрируются случаи возникновения различных осложнений после введения данных препаратов. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного.

Целью данной работы было создание двух белков – VP6VP8 и FltCVP6VP8 и определение их антигенности. FltCVP6VP8 включает участки белков VP6 и VP8 ротавируса А и компоненты флагеллина *Salmonella* в качестве адьюванта, соединенные гибкими мостиками. Белок VP6VP8 содержит перечисленные элементы, кроме компонентов флагеллина. Представленные фрагменты являются консервативными частями белков VP6, VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфические антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами различных штаммов ротавирусов А, В и С. Использование эпитопов не-

скольких белков позволяет увеличить эффективность вакцины, а использование гибких мостиков – сохранить правильную пространственную укладку белка, обеспечивающую полноценное функционирование каждого эпитопа. Многочисленные исследования показывают, что рекомбинантные белки, вводимые с флагеллином, имеют повышенные иммуногенные и антигенные характеристики. Ответы на них регистрируются в более короткие сроки и вызывают более сильный клеточный и гуморальный иммунный ответ.

Аминокислотные последовательности смоделированных белков были переведены в нуклеотидные и оптимизированы для экспрессии в клетках *E.coli*. Синтез генов *vp6vp8* и *flicvp6vp8* осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов, синтезированных химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800. Полученные гены клонировали в экспрессионный вектор pET-28a(+). Созданы штаммы на основе клеток *E.coli* DH10B/R для амплификации векторов pET-28a(+)*vp6vp8* и pET-28a(+)*flicvp6vp8*. Созданы штаммы-продуценты рекомбинантных белков VP6VP8 с максимальной продуктивностью 29% от общего клеточного белка и FliCVP6VP8 с максимальной продуктивностью 22%, на основе клеток *E.coli* BL21 (DE3). Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гибридных генов с использованием 0,2 % лактозы (по Штудииеру). Разработан метод очистки рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 на основе последовательного применения иммобилизованной металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях и гель-фильтрации в нативных условиях, позволяющий получать белок VP6VP8 с чистотой 98%, выход 5,6 мг при выделении из 1 литра жидкой культуры штамма-продуцента, и FliCVP6VP8 с чистотой 97% , выход 3,8 мг из 1 литра. Антигенные свойства белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 изучались путем иммунизации самок мышей линии Balb/c и последующей оценки титра антител на вводимые белки. Рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 обладают иммуногенностью у мышей линии Balb/c, вызывая формирование высокого титра специфических антител в сыворотке крови при подкожном введении. Белок FliCVP6VP8 вызывал образование высокого титра антител (1:128000) уже после второй иммунизации за счет наличия фрагмента флагеллина в составе гибридного белка. Белок VP6VP8 вызывал образование высокого титра антител (1:128000) после третьей иммунизации. Планируется провести исследование протективности полученных белков. Это позволит создать и внедрить безопасную вакцину против ротавируса, эффективно действующую против тяжёлых форм заболевания.

**О. А. Добровольская, Е. А. Федорова, Е. К. Черняева
И. В. Духовлинов, А. С. Симбирцев**

*Государственный научно-исследовательский институт
особо чистых биопрепаратов ФМБА России*

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА TB10.4
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI***

В настоящее время туберкулез является одной из самых актуальных проблем здравоохранения в мире и в Российской Федерации. Начиная с 90-х годов XX века, в России произошло ухудшение эпидемической ситуации. Основной причиной смерти от инфекционных и паразитарных заболеваний сегодня, как и в начале XX века, является туберкулез. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), туберкулезом ежегодно болеет около 8 млн. человек, и около 3 млн. заболевших погибает.

Возбудителем туберкулеза служит *Mycobacterium tuberculosis*, реже – родственные ей виды *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium africanum*. Источником инфекции служат больные активными формами туберкулеза легких. Заражение чаще всего происходит воздушно-пылевым путем. Чаще всего болезнь поражает легкие, однако в трети случаев страдают другие органы. В пораженных органах развиваются мелкие бугорки со склонностью к "творожистому" (казеозному) распаду.

Если заболевание вызвано чувствительными к противотуберкулезным средствам штаммами микобактерий, правильно назначенное лечение практически всегда дает эффект. Без лечения более половины случаев в течение 5 лет заканчиваются смертью. Однако в последние годы широкое распространение получили устойчивые к противотуберкулезным средствам штаммы микобактерий, лечение вызванного ими туберкулеза проходит крайне сложно, и велико количество случаев с летальным исходом. В связи с этим правильным подходом представляется предупреждение заболевания, вакцинация.

В настоящее время единственной зарегистрированной и используемой вакциной является BCG (БЦЖ). БЦЖ была получена из аттенуированного штамма *Mycobacterium bovis* и впервые введена человеку в 1921 г. В мире существует много разновидностей этой вакцины; все они – производные одного штамма, но значительно различаются между собой по эффективности. Сомнительная эффективность вакцинации BCG и побочные эффекты заставляют научное сообщество разрабатывать эффективные средства вакцинации против *Mycobacterium tuberculosis*.

Можно выделить ряд направлений разработки новых противотуберкулезных вакцин, одним из которых является создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков. Субъединичными называют вакцины, которые содержат только отдельные компоненты патогенного микроорганизма – рекомбинантные белки или синтетические пептиды, содержащие основные эпитопы антигенов, активно распознаваемые иммунной системой хозяина. Достоинства субъединичных вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в организме-хозяине.

На данный момент идентифицирован ряд антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, перспективных для использования в качестве компонентов новых вакцин. Так, культуральный фильтрат *Mycobacterium tuberculosis* содержит иммунодоминантные секретируемые антигены, среди которых наиболее изучены антигены ESAT-6 (Early Secret Antigen Target-6), CFP-10 или TB10.4.

По уровню синтеза γ -интерферона мононуклеарными клетками периферийной крови доноров в ответ на их контакт с соответствующими антигенами низкомолекулярный белок TB10.4 демонстрирует наибольшую иммуногенность. Белок распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию интерферона γ (ИФН- γ) – основного фактора протективного иммунитета. Учитывая эти свойства, рекомбинантный белок TB10.4 может быть использован для создания новых кандидатных вакцин против туберкулеза.

Цель работы заключается в получении высокоочищенного рекомбинантного белка TB10.4 в клетках *E.coli*.

Нами была получена нуклеотидная последовательность, кодирующая белок TB10.4, оптимизированная для получения высокого уровня экспрессии в клетках *E.coli*. Создан вектор pET-28a(+)-tb10.4, несущий ген, кодирующий рекомбинантный белок TB10.4, на основе плазмиды pET-28a(+). Посредством трансформации клеток *E.coli* плазмидной ДНК методом электропорации был создан штамм *E.coli* DH10B/R pET-28a(+)-tb10.4, для амплификации плазмидной ДНК. Также был создан высокопродуктивный штамм *E.coli* BL21 (DE3) pET-28a(+)-tb10.4 - продуцент рекомбинантного белка TB10.4. Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена, кодирующего белок TB10.4, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах - индукция 0,5 mM ИПТГ.

В настоящий момент ведется работа над получением рекомбинантного белка TB10.4 в чистом виде с использованием металлоаффинной хроматографии.

С. А. Долгушин¹, А. Ю. Герасименко¹, А. С. Лукин¹
Е. С. Одинцова^{2,3}, А. В. Тронин²

¹ ОАО «Зеленоградский инновационно-технологический центр»

² ЗАО «МБС-Технология»

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ИММУНОГЛО- БУЛИНОВ КЛАССА G К TORCH-ИНФЕКЦИЯМ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ *

Диагностика инфекций группы TORCH проводится, как правило, у беременных женщин. Особенность патогенеза заключается в преодолении инфекциями плацентарного барьера и пагубном действии на все системы и органы плода, особенно на его центральную нервную систему, повышая риск выкидыша, мертворождения и врожденных уродств ребенка. Часто первичное инфицирование беременной женщины является прямым показанием к прерыванию беременности.

Серологический скрининг является рутинной практикой по всему миру из-за неспецифического клинического проявления и необходимости ранней диагностики данных внутриутробных инфекций. В настоящее время основными методами анализа на инфекции TORCH комплекса являются иммуноанализ и полимеразная цепная реакция. Недавно предложена новая технология мультиплексного анализа на основе жидких биочипов – биочипов на основе суспензий кодируемых микроносителей (суспензионных микрочастиц или жидких биочипов). Технология основывается на использовании спектрально кодируемых полистирольных микросфер с присоединенными к их поверхности распознающими молекулами (зондами, в данной работе к микросферам были присоединены антигены вируса краснухи, цитомегаловируса (ЦМВ), *T.gondii*). В конечном итоге, каждая такая микросфера является отдельным элементом биочипа, который распознается по уникальному спектральному коду, и характеризуется уникальной распознающей молекулой (зондом), присоединенной к его поверхности. В результате становится возможным осуществить прецизионную регистрацию именно того химического соединения (региструемого объекта), на идентификацию которого направлен данный элемент биочипа. Анализ осуще-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации (государственный контракт № 13411.1008799.13.201), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-02-31286) и Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.575.21.0044).

ствляется на полностью автоматизированных высокопроизводительных устройствах, использующих принципы проточный цитометрии.

В результате выполнения работы был разработан макет набора реагентов для мультиплексного выявления IgG к антигенам *T. gondii*, вирусу краснухи и ЦМВ в сыворотке крови человека методом иммунофлуоресцентного анализа на меченных органическим красителями полистироловых микросферах. Разработаны методики ковалентной иммобилизации антигенов на поверхность микросфер, разработана методика и подобраны оптимальные условия проведения иммунофлуоресцентного анализа с помощью макета набора. Система была протестирована на панели сывороток, содержащих и не содержащих антитела класса G к TORCH-инфекциям. Диагностическая чувствительность набора составила 95.6 %.

Е. В. Зонов ¹, А. Ю. Юнусова ¹
Г. В. Кочнева ², Е. И. Рябчикова ¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

МЕХАНИЗМЫ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АПОПТИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Онколитические вирусы (ОВ) способны селективно поражать опухолевые клетки. Вирус осповакцины (ВОВ) рассматривают как один из перспективных вирусов для создания рекомбинантных ОВ, в частности, путем встройки в геном вируса трансгенов. Белок вируса анемии цыплят апоптин привлекает внимание исследователей способностью избирательно индуцировать апоптоз в опухолевых клетках и считается перспективным трансгеном. Целью данной работы явилось изучение механизмов онколитического действия рекомбинантного ВОВ VVdGF-ApoS24/2, содержащего встройку гена апоптоина на ксенографты карциномы человека A431 у иммунодефицитных мышей nude.

Мышам nude (8-10 недель) подкожно прививали карциному человека A431 (10^6 клеток на мышь). Через 10 дней у всех мышей сформировались опухолевые узлы 7-8 мм в диаметре. Мышам однократно интратуморально вводили ВОВ VVdGF-ApoS24/2 ($2 \cdot 10^7$ БОЕ/мышь) в 100 мкл физраствора. В качестве контроля использовали мышей с инъекцией исходного ВОВ штамма Л-ИВП ($2 \cdot 10^7$ БОЕ/мышь, 100 мкл) и инъекцией физраствора (100 мкл). Ежедневно проводили измерение объема опухолевых узлов.

Мышей выводили из эксперимента через 2, 4, 8, 36 и 55 суток, иссекали опухолевые узлы и фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обрабатывали стандартными способами для светооптического и ультраструктурного исследований.

Штаммы BOB Л-ИВП и VVdGF-ApoS24/2 активно размножались в клетках карциномы A431, и уже через 2 суток после инъекций наблюдалось большое число зараженных клеток. Титр BOB Л-ИВП в ткани опухоли был выше, чем титр VVdGF-ApoS24/2. Через 4 суток после инъекций оба штамма BOB распространились по всему первичному узлу, зараженные опухолевые клетки наблюдались у капсулы. Размножение обоих штаммов BOB в опухолевых клетках сопровождалось появлением в цитоплазме «типичных» признаков размножения ортопоксвирусов: вироплазмы, скоплений сферических незрелых и овоидных зрелых вирионов. Образование особой формы вируса, «одетых» вирионов, наблюдали в ходе размножения обоих штаммов BOB. Отметим, что BOB Л-ИВП и VVdGF-ApoS24/2 размножались исключительно в опухолевых клетках, не было обнаружено признаков репликации BOB в клетках соединительной ткани, клетках эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов.

В ходе размножения рекомбинантного BOB VVdGF-ApoS24/2 иммуногистохимически была показана экспрессия белка апоптоина и его локализация в цитоплазме клеток. Однако, ожидаемое влияние апоптоина на процессы гибели опухолевых клеток путем апоптоза обнаружено не было, что, скорее всего, объясняется наблюдаемой цитоплазматической локализацией апоптоина, тогда как для запуска апоптоза необходима ядерная локализация апоптоина.

Прямые измерения опухолевых узлов показали, что рост опухолей с введением BOB замедлялся и впоследствии останавливался, в то время как размеры опухолей с введением физраствора продолжали увеличиваться. Опухоли с введением BOB VVdGF-ApoS24/2 на поздних сроках эксперимента имели меньшие размеры чем опухоли с введением BOB Л-ИВП. При вскрытии опухолевые узлы с введением BOB Л-ИВП были заполнены жидкостью, тогда как после инъекции BOB VVdGF-ApoS24/2 опухолевые узлы были «сухими».

Гистологическое исследование парафиновых срезов показало, что после введения BOB обоих штаммов в течение 8 суток в опухолевых узлах значительно увеличивалась зона некроза опухолевой ткани по сравнению с узлами с введением физраствора. Уже через 2 суток после инъекций штаммов BOB в опухолевых узлах наблюдалась зона размножения вируса, для которой характерно наличие градиента деструктивных изменений опухолевой ткани. Через 8 суток после введения BOB в опухолевых узлах отсутствовали неповрежденные опухолевые клетки и опухолевые клетки, способные к пролиферации, всю площадь срезов первичных узлов занима-

ла зона некроза. В опухолевых узлах после введения физраствора клетки сохраняли пролиферативную активность, относительный размер зоны некроза не увеличивался.

Через 36 и 55 суток после инъекций опухолевые узлы с введением BOB Л-ИВП были заполнены клеточным детритом, липидными каплями, частицами вируса. Узлы с введением BOB VVdGF-ApoS24/2 были заполнены бесструктурным материалом, представляющим собой скопления волокон толщиной 8-11 нм. Скопления волокон повторяют очертания клеток, образуя «мумии». По-видимому, наблюдаемые волокна являются актиновыми филаментами, что было подтверждено *in vitro*: заражение клеток карциномы A431 рекомбинантным штаммом BOB VVdGF-ApoS24/2 приводило к накоплению актиновых филаментов в цитоплазме клеток.

Через 8 суток после инъекций BOB в соединительнотканной капсуле и в ткани опухолевых узлов присутствовали нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги. На более ранних сроках эксперимента число клеток лейкоцитарного ряда было незначительно. Признаков воспалительной реакции в опухолевом узле на всем протяжении эксперимента обнаружено не было.

Исследование показало выраженный онколитический эффект встройки гена апоптоина в геном BOB. Рекомбинант, экспрессирующий апоптоин, вызывал уменьшение размеров опухоли и ее «усыхание», не связанные с проапоптотическим действием апоптоина.

К. Э. Зубарева^{1,2}, **А. О. Соловьева**^{2,3}, **М. А. Шестопалов**^{2,4}
А. Ф. Повещенко^{2,3}, **Е. А. Нечаева**¹

¹ Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»

² Институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН

³ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии
кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина

⁴ Институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ОКТАЭДРИЧЕСКИХ КЛАСТЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Октаэдрические кластерные комплексы рения являются перспективными соединениями для биовизуализации и фотодинамической терапии в качестве фотосенсибилизаторов. Для биологического применения данных

веществ, в первую очередь необходимо исследовать их токсичность и способность проникать в клетку.

Целью данного исследования является тестирование новых фотоактивных соединений на культурах клеток.

Нами изучена потенциальная токсичность кластерных соединений рения на культуре опухолевых клеток человека Нер – 2. Влияние поглощенных клетками веществ, таких как $[\text{Re}_6\text{S}_8(\text{IH- BTA})_6]^{4+}$ и $[\text{Re}_6\text{Se}_8(\text{IH- BTA})_6]^{4+}$, оценивали с помощью МТТ (диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразола). При добавлении этих соединений в дозе выше 100 μM показано подавление клеточной пролиферации. 50% – ная ингибирующая концентрация (IC_{50}) для $[\text{Re}_6\text{S}_8(\text{IH- BTA})_6]^{4+}$ составила 121,6 μM , для $[\text{Re}_6\text{Se}_8(\text{IH- BTA})_6]^{4+}$ – 101,4 μM . Таким образом, для применения в системе *in vivo* может быть рекомендовано использование этих соединений в концентрации до 100 μM .

Для терапевтического применения кластерные комплексы рения должны легко поглощаться клетками. Нами исследовано клеточное поглощение $[\text{Re}_6\text{S}_8(\text{IH- BTA})_6]^{4+}$ и $[\text{Re}_6\text{Se}_8(\text{IH- BTA})_6]^{4+}$ в концентрации 12,5; 25 и 50 μM на культуре клеток Нер-2 с помощью конфокальной микроскопии. Показано, что исследованные соединения в использованных концентрациях проникают в клетку. Зоны накопления этих веществ в клетке по форме, размерам и локализации напоминают комплекс Гольджи и прилегающие к нему участки эндоплазматического ретикула. Точная идентификация локализации препаратов в клетке может быть изучена с помощью специфических маркеров цитоплазматических органелл, что является предметом наших дальнейших исследований. Вероятно, что по мере проникновения в клетку эндоцитозом, исследуемые соединения сначала попадают в эндоплазматический ретикулум, откуда переходят в комплекс Гольджи, что может отражать защитную реакцию клеток.

Количественное накопление исследуемых веществ в клетке в зависимости от концентрации было изучено при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого, клетки Нер-2 инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрациях 12,5; 25 и 50 μM в течении 24 часов. Было показано, что интенсивность флуоресценции окрашенных клеток прямо пропорциональна концентрации препаратов.

Таким образом, тестирование на культурах клеток исследуемых соединений показало, что кластерные комплексы имеют потенциал для применения в качестве флуоресцентных красителей для биовизуализации и фотодинамической терапии.

Итак кластерные комплексы имеют потенциал для применения в качестве витальных (прижизненная окраска) флуоресцентных красителей для биоимиджинга. Одним из основных преимуществ является эмиссия кластеров в красной области спектра, где интенсивность аутофлуоресценции биологической ткани наименьшая.

А. А. Эрст, Т. И. Новикова, О. В. Дорогина, Е. В. Банаев

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО СЫРЬЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *

Получение сырья лекарственных растений с использованием методов биотехнологии является все более востребованным альтернативным источником ценных вторичных метаболитов. Это обусловлено ограниченностью запасов лекарственного сырья, невозможностью выращивания многих видов с помощью плантационного метода, а также трудностями разработки путей химического синтеза ряда природных соединений. Предлагаемый подход основан на технологии «*hairy roots*» (HRs) – культура изолированных корней лекарственных растений, полученная при помощи почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*. Культура HRs характеризуется высокими темпами роста и синтезирует вещества характерные исходному лекарственному растению. Высокая стабильность биосинтеза и продуктивность позволяют использовать культуру HRs как альтернативный источник получения вторичных метаболитов лекарственных растений. Биотехнологический подход имеет ряд преимуществ перед традиционным способом выращивания растительного сырья, благодаря возможности получения биомассы независимо от сезона, климатических и почвенных условий, а также простоте экстракции и очистки препаратов, усилению биосинтеза нужных веществ с помощью элиситоров и автоматизации процесса. Кроме того, культура HRs является инструментом для изучения биохимических путей биосинтеза веществ и генетической экспрессии, для метаболической инженерии лекарственных растений. Перспективность применения этой методики для получения лекарственного сырья подтверждена на таких видах растений как женьшень и шалфей (Yu et al., 2000, Pistelli et al., 2010).

* Работа выполнена при финансовой поддержке: Совместного конкурса проектов фундаментальных исследований НАН Беларуси и СО РАН № 01201282772, интеграционных проектов № 20 и № 12-С-4-1028 и проекта № 30.3 Программы РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Технология HRs особенно актуальна для редких, медленнорастущих и требовательных к условиям выращивания растений. К таким объектам относится *Hedysarum theinum* L. (Fabaceae) – редкий высокогорный альпийский вид, имеющий центральноазиатско-южносибирский ареалы (Красноборов и др., 1985; Курбатский, 1994). В результате практики массовых заготовок сырья, копеечник чайный в наиболее доступных популяциях находится на грани исчезновения. Чрезвычайно медленный рост делает этот вид особенно уязвимым. Корни считаются зрелыми и пригодными к заготовке в 30 лет.

По данной теме проводятся совместные исследования в лабораториях Биотехнологии и Интродукции редких и исчезающих видов растений ЦСБС СО РАН. Разработан комплексный подход изучения продуктивности культуры тканей и органов *H. theinum in vitro*, который включает два этапа: начальный этап работы заключается в отборе наиболее перспективных генотипов для введения в культуру *in vitro*; на следующих этапах работы проводят отбор линий по продуктивности биомассы и вторичных метаболитов в культуре *in vitro* и выявляют наиболее оптимальные типы эксплантов и способы культивирования.

В настоящее время, проведен отбор популяций *H. theinum* по продуктивности биомассы. Разработан оригинальный подход к отбору популяций *H. theinum* на основе связи между морфологической изменчивостью вида по признакам продуктивности и генетической изменчивостью по электрофоретическим спектрам полипептидов семян.

Проведен сравнительный биохимический анализ растений *H. theinum* из культуры *in vitro* и интактных растений на содержание дубильных веществ, флавонолов, катехинов и ксантонов. Показано, что различные типы эксплантов *H. theinum* в культуре *in vitro* способны синтезировать биологически активные вещества, содержащиеся как в надземной, так и в подземной частях растений. Содержание катехинов и флавонолов не уступает содержанию этих веществ в интактных растениях в отдельные фазы онтогенеза.

Разработан протокол размножения *H. theinum* в культуре пазушных почек *in vitro* и проведена идентификация регенератов с помощью ISSR-маркеров. В результате проведенного исследования подтверждена генетическая стабильность полученных регенерантов на протяжении 5 пассажей и их идентичность материнскому растению.

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности использования культуры тканей и органов *H. theinum* как потенциального источника лекарственного сырья и о перспективности дальнейших исследований с целью получения линий копеечника чайного с высоким уровнем биосинтеза БАВ в культуре *in vitro*.

Список литературы

Красноборов И.М., Азовцев Г.Р., Орлов В.П. Новый вид рода *Hedysarum* L. (Fabaceae L.) из Южной Сибири // Бот. журн. 1985. Т. 70 (7). С. 968-973.

Курбатский В.И Род *Hedysarum* L. В: Флора Сибири, Положий А.В и др. (ред.), Новосибирск: Наука. 1994. Т. 9. С.153-166.

Yu K.-W., Gao W.-Y., Son S.-H., Paek K.-Y. Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) // In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. 2000. V. 36. P. 424-428.

Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L. Hairy root cultures for secondary metabolites production // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 698. P.167–179.

**Т. И. Есина, О. Ю. Мартынова, В. К. Михайлова, Г. Г. Шимица
Е. С. Цыпленкова, С. Г. Гамалей, Г. М. Сысоева
Г. М. Левагина, Е. Д. Даниленко**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

ВЫБОР ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СОХРАННОСТЬ СТРУКТУРЫ ГРАНУЛОЦИТ- КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА В СОСТАВЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Лекарственные средства на основе рекомбинантного гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека (рЧГ-КСФ) активно применяются как стимуляторы кроветворения для восстановления нейтрофилов и лейкоцитов у больных нейтропенией, у онкологических больных, проходящих химиотерапию и лучевую терапию, при пересадках костного мозга, органов, тканей, для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ.

Гемостимуляторы на основе Г-КСФ обычно вводят в организм пациента путем ежедневных инъекций. В качестве привлекательной альтернативы парентеральной инъекции, оральный путь введения лекарственного средства позволяет избежать боли и побочных эффектов, связанных с ежедневными инъекциями. Оральный путь введения лекарства также достаточно прост для того, чтобы принимать лекарство самостоятельно, и не требует помощи медицинского персонала. Основным фактором, являющимся причиной низкой эффективности при пероральном введении био-

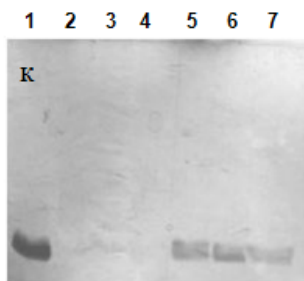
логических препаратов являются пресистемная ферментативная деградация и низкая степень проникновения через эпителий кишечника.

С целью повышения активности биологических препаратов актуальным является создание такой лекарственной формы, которая защитила бы активный белок от инактивации в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и улучшила бы свойства препарата при пероральном приеме. Этот эффект может быть достигнут за счёт правильно подобранных вспомогательных веществ, которые обеспечат сохранность активного белка в кислой среде желудка и сведут пресистемную деградацию к минимуму.

Целью исследования являлось получение композиций для перорального применения на основе рЧГ-КСФ и вспомогательных веществ, изучение сохранности структуры и гемостимулирующей активности рЧГ-КСФ в составе композиций.

Проведён литературный поиск вспомогательных веществ, обеспечивающих защиту биологически активных молекул в условиях ЖКТ. В работе использовали вспомогательные вещества природного и синтетического происхождения. Для исследования выбраны следующие вещества: декстран, поливинилпирролидон (ПВП), каррагинаны различных молекулярных масс, лактоза, композиционный полимерный носитель (КПН-1), поливиниловый спирт, желатин. Всего для исследований получено 12 образцов композиций для перорального применения на основе рЧГ-КСФ с различными вспомогательными веществами. В ходе работы исследовали сохранность структуры рЧГ-КСФ в составе композиций для перорального применения в условиях моделирующих среду желудка (раствор соляной кислоты pH 1,2) и тонкого кишечника (фосфатно-солевой буфер pH 6,8). Пробы инкубировали в термостате при постоянном перемешивании при 37°C в течение 40 минут. Сохранность структуры рЧГ-КСФ оценивали методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле.

На рис. 1 представлена электрофореграмма образца композиции рЧГ-КСФ с ПВП и образца композиции рЧГ-КСФ с декстраном. Исходя из данных электрофореграммы, можно сделать вывод о сохранности или деградации белкового компонента в образце композиции для перорального применения. На дорожках 2, 3, 4 представлен образец композиции рЧГ-КСФ с ПВП, структура рЧГ-КСФ в его составе оказалась неустойчивой к воздействию среды желудка и среды тонкого кишечника. На дорожках 5, 6, 7 представлен образец композиции рЧГ-КСФ с декстраном, структура рЧГ-КСФ в его составе является устойчивой к воздействию среды желудка и среды тонкого кишечника, молекулярная масса рЧГ-КСФ относительно контроля не изменилась. В качестве контроля на дорожке 1 представлена субстанция рЧГ-КСФ. Электрофореграммы образцов композиций рЧГ-КСФ с вспомогательными веществами, устойчивых к воздействию среды желудка и тонкого кишечника, соответствуют дорожкам 5–7 на рис. 1.



1. Контроль – рЧГ-КСФ с 040913
2. Образец композиции рЧГ-КСФ с ПВП, разбавленный водой
3. Образец композиции рЧГ-КСФ с ПВП, не устойчивый в среде желудка, pH=1,2
4. Образец композиции рЧГ-КСФ с ПВП, не устойчивый в среде тонкого кишечника, pH=6,8
5. Образец композиции рЧГ-КСФ с декстраном, разбавленный водой
6. Образец композиции рЧГ-КСФ с декстраном, устойчивый в среде желудка, pH=1,2
7. Образец композиции рЧГ-КСФ с декстраном, устойчивый в среде тонкого кишечника, pH=6,8

Рис. 1. Электрофореграмма образца композиции рЧГ-КСФ с ПВП и образца композиции рЧГ-КСФ с декстраном

Все вспомогательные вещества, выбранные для защиты структуры рЧГ-КСФ в составе композиции для перорального применения, за исключением ПВП обеспечивали необходимый эффект.

Гемостимулирующую активность рЧГ-КСФ в составе полученных композиций для перорального применения оценивали на модели цитостатической миелосупрессии у мышей линии СВА, вызванной введением циклофосфана (ЦФ) в максимально переносимой дозе.

Исследуемые препараты вводили четырехкратно, внутривентрикулярно, один раз в день, в дозах 125, 250 и 1250 мкг/кг в объеме 0,2 мл на 20 г массы тела. Гемостимулирующие свойства образцов композиции для перорального применения оценивали на пятые сутки после введения ЦФ по показателю числа сегментоядерных нейтрофилов относительно значений контрольных мышей, принятых за 100 %.

Образцы композиций для перорального применения на основе рЧГ-КСФ по-разному влияли на скорость восстановления кроветворения. Все образцы имели одно действующее начало, а показатели количества сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с контрольным показателем отличаются в исследуемых образцах. Этот факт свидетельствует о влиянии вспомогательных веществ на гемостимулирующую активность Г-КСФ в составе пероральной лекарственной формы.

Установлено, что оптимальной дозой для создания композиционного препарата на основе Г-КСФ для перорального применения является 125 мкг/кг. Надо отметить, что эта доза является эффективной при подкожном введении мышам. Перспективными вспомогательными веществами показали себя реополиглюкин, каррагинан SI-80, лактоза.

Таким образом, на основании суммарных данных физико-химических и фармако-токсикологических исследований при создании композиции для перорального применения на основе гранулоцит-колониестимулирующего фактора, целесообразно было бы продолжить работу с такими вспомогательными веществами, как реополиглюкин и лактоза.

**Ю. С. Макушева¹, Н. В. Рубцова¹, Н. В. Губанова¹, А. С. Гайтан²
А. Л. Кривошапкин², В. А. Мордвинов¹**

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН

*² Новосибирский научно-исследовательский институт патологии
кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина*

ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Глиомы, или глиальные опухоли, – часто встречающиеся опухоли головного мозга, происходящие из клеток глии и их предшественников. В России ежегодно глиомы диагностируют примерно у 10 тысяч пациентов. Несмотря на существующие в настоящее время комплексные подходы в лечении глиом эффективность терапии остается крайне низкой, в особенности при глиомах высоких степеней злокачественности.

В настоящее время разрабатываются новые методы диагностики и лечения опухолевых заболеваний с использованием культур клеток. Во многих экспериментальных работах используются постоянные перевиваемые культуры клеток, однако соответствие длительно выращиваемых культур исходным образцам ткани и, вследствие этого, их пригодность как модели для изучения заболевания подвергается сомнению. Альтернативой постоянным перевиваемым культурам могут быть первичные культуры клеток, выращиваемые в течение ограниченного количества пассажей. Именно такие культуры могут служить адекватной моделью для изучения заболевания *in vitro*. Высокая гетерогенность глиом обуславливает необходимость использования в практических и экспериментальных целях культуры клеток, полученные из опухолей разных пациентов. В этой связи создание коллекции первичных культур клеток злокачественных глиальных опухолей головного мозга человека представляется весьма актуальной задачей.

В нашем институте ведутся работы по созданию коллекции культур клеток из биопсийного материала глиом головного мозга взрослых людей. В течение трех лет нами были собраны и обработаны около 50 образцов различных типов злокачественных глиом. Целью нашей работы является

получение первичных культур глиом, активно растущих в течение минимум 10 пассажей и сохраняющих характеристики исходной опухоли. Нами были отработаны методы дезагрегации биопсийного материала опухолей для дальнейшего получения клеточных культур. Кроме того была показана возможность получения культур клеток после длительного хранения обработанного образца опухоли в жидком азоте. Для культивирования клеток использовались различные ростовые среды, которые отличались содержанием эмбриональной сыворотки и специальных добавок, стимулирующих пролиферацию клеток. В зависимости от условий культивирования и свойств исходной опухоли клетки в первичной культуре могли расти в виде плавающих сфер (нейросфер) или в виде монослоя прикрепленных к субстрату клеток.

Заключение. Формирование нейросфер и/или монослоя в культуре зависит от градации опухоли. Для клеток глиом высоких градаций (глиобластом IV градации), а также олигоастроцитом более характерным был рост в виде плавающих нейросфер, в то время как клетки опухолей III градации росли только в виде монослойных прикрепленных культур клеток. По нашему мнению, параллельное использование двух вариантов культивирования – плавающих нейросфер и монослоя клеток – в значительной степени расширяет возможности получения первичных перевиваемых культур от каждой индивидуальной опухоли.

А. А. Нуштаева¹, О. А. Коваль¹, Г. Р. Сакаева^{1,2}, Л. Ф. Гуляева²
А. В. Герасимов³, Е. В. Кулигина¹, В. А. Рихтер¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН

³ Государственный областной онкологический диспансер

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ОСНОВА ПРИ ПЕРСОНАЛИЗОВАННОМ ПОДХОДЕ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОБОЛЬНЫХ

Онкологические заболевания являются одной из главных причин смертности взрослого населения России. Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкозаболеванием среди женщин. Стандартная схема лечения пациентов со злокачественными опухолями молочной железы включает в себя хирургическое удаление опухоли (лампэктомию или мастэктомию) в сочетании с лучевой терапией, гормональной терапией и химиотерапией. Химиотерапия является одним из главных методов лечения РМЖ. Эффективность химиопрепаратов доказана при лече-

нии уницентрического роста опухоли, а также при мультицентрическом росте и при процессе метастазирования. В качестве химиотерапевтических средств используют соединения с различными молекулярными механизмами действия: алкилирующие соединения, антиметаболиты, ингибиторы образования веретена деления, противоопухолевые антибиотики, таксаны. Большинство используемых химиопрепаратов вызывают значительные побочные эффекты, ограничивающие их применение (Соухами Р., Тобиас Дж., 2009).

Линии клеток опухоли молочной железы широко используются как модели для исследования нарушения регуляции пролиферации, апоптоза и миграции раковых клеток в опухолевой прогрессии (Lacroix M., Leclercq G., 2004). Существующие опухолевые линии имеют свои преимущества в исследовании: простота культивирования, относительная легкость генетических манипуляций и воспроизводимые количественные результаты. В то же время, ни одна из существующих клеточных линий не может полностью воспроизвести рак молочной железы человека. Длительное культивирование иммортализованных опухолевых линий приводит к появлению субпопуляций внутри линии, которые изменяют общие характеристики линии. В качестве решения указанных проблем в настоящее время разрабатывается несколько подходов, базирующихся на создании систем первичных культур клеток (Vargo-Gogla T., Rosen J., 2007).

Первичные клеточные культуры из нормальных и трансформированных тканей способны поддерживать большую часть фенотипических признаков индивидуальной ткани. Кроме того, первичные культуры могут являться модельными системами при изучении путей клеточной гибели/пролиферации, а также ответов опухоли на внешние стимулы (исследование чувствительности клеточной культуры к действию противоопухолевых препаратов) (Speirs V. et.al., 1996). В настоящее время одним из перспективных подходов при терапии онкологических заболеваний является персонализация, когда схема лечения назначается исходя из молекулярной характеристики опухоли конкретного пациента. Молекулярная характеристика может быть проведена при тестировании противоопухолевых препаратов на культуре опухолевых клеток пациента. Такой подход позволит оптимизировать лечение для пациента (выбрать препарат или комбинацию, к которому опухоль будет более чувствительна, подобрать оптимальные дозы). Таким образом, может быть повышена эффективность лечения и устранены значительные токсические эффекты от химиотерапии.

Создание противораковых препаратов, вызывающих гибель раковых клеток и не оказывающих токсического действия на здоровые, немалигнизированные клетки организма является одним из важнейших направлений исследований в области практической онкологии. Известно, что суще-

ствуют природные белки и пептиды, обладающие способностью направленно и специфически индуцировать апоптоз раковых клеток. Некоторые из них в настоящее время успешно используются в клинической практике, а целый ряд представителей этого класса соединений проходит различные этапы доклинических и клинических испытаний. Ранее сотрудниками ЛБТ ИХБФМ СО РАН было установлено, что в человеческом молоке присутствуют природный пептид, фрагмент каппа-казеина человека, обладающий цитотоксическим действием на раковые клетки человека в культуре – лактаптин. К настоящему времени получен рекомбинантный аналог лактаптина RL2, и показано апоптотическое действие этого аналога на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в культуре (Некипелая В.В. и др., 2008, Semenov D. V., et. al., 2010). Модели опухоли молочной железы человека могут быть использованы в дальнейшем для тестирования других новых противоопухолевых и антиметастатических препаратов. Поэтому полученные модели опухоли молочной железы человека могут стать важной основой для изучения доклинических и клинических исследований рекомбинантного аналога лактаптина.

Цель работы: разработка протокола получения и молекулярного типирования опухолей РМЖ для прогностической оценки метастатического потенциала и тестирования чувствительности к действию противоопухолевых препаратов.

Результаты: были разработаны способы получения первичных клеточных культур нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы. Полученные первичные клеточные культуры из образцов ткани молочной железы были окрашены с помощью гематоксилин-эозина и дали схожие по морфологии популяции клеток. Методами ОТ-ПЦР, иммуноцитохимии и проточной цитометрии фрагменты эксплантов, из которых получали первичные культуры, и полученные клеточные культуры были охарактеризованы на наличие гормональных рецепторов (эстрогеновые (альфа и бета) и прогестероновый), маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (альфа-актин гладких мышц, люминальные и базальные цитокератины, виментин и белок клеточной пролиферации Ki-67. Для разработки протоколов исследования чувствительности первичных культур к анти-раковым препаратам на первом этапе проводили расчет времени удвоения популяции клеток и определяли раннюю логарифмическую фазу роста культур. Для этого использовали систему xCelligence (ASEA Bioscience, США), которая позволяет исследовать динамику роста адгезивных культур клеток в режиме реального времени. Действие прибора основано на том, что в подложку для роста клеток встроены электроды, и присутствие клеток на поверхности электродов влияет на локальное ионное окружение на границе электрод/раствор: чем больше клеток прикрепляется к электродам, тем выше будет сопротивление. Сопротивление

является измеряемой величиной (Cell Index, CI) при оценке скорости пролиферации, числа клеток, изменения морфологии и выживаемости клеток. Методом МТТ-теста исследована чувствительность первичных клеточных культур к традиционным противоопухолевым препаратам и лактаптину, выбраны оптимальные концентрации препаратов. Исследование пролиферации клеток в режиме реального времени на приборе xCelligence позволило исследовать цитотоксическое действие различных противоопухолевых препаратов в динамике.

Заключение: В ходе работы были получены первичные клеточные культуры из нормальной и онкотрансформированной ткани молочной железы. Все полученные клеточные культуры были охарактеризованы на наличие гормональных рецепторов (эстрогеновые (альфа и бета) и прогестероновый), маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (альфа-актин гладких мышц, люминальные и базальные цитокератины, виментин и белок клеточной пролиферации Ki-67).

Продемонстрированы принципиальные преимущества исследования цитотоксического действия противоопухолевых препаратов в динамике на приборе xCelligence. Разработаны протоколы исследования цитотоксичности противоопухолевых препаратов методом МТТ. Разработаны протоколы исследования цитотоксичности противоопухолевых препаратов в динамике на приборе xCelligence.

Список литературы

Некипелая В.В., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Кит Ю.Я., Романова И.В., Рихтер В.А. Лактаптин – белок человеческого молока, индуцирующий апоптоз клеток аденокарциномы MCF-7 // Доклады Академии Наук. – 2008. – Т. 419. № – С. 268-271

Соухами Р., Тобиас Дж. Рак и его лечение. // Бином, М. 2009, С. 203

Lacroix M., Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. // Breast Cancer Res. Treat. – 2004. – p. 249-289

Semenov D. V., Fomin A. S., Kuligina E. V., Koval O. A., Matveeva V. F., Babkina I.N., Tikunova N. V., Richter V. A. Recombinant analogues of novel milk pro-apoptotic peptide lactaptin and their effect on cultured human cells. // The Protein Journal – 2010.- V. 29 (3). – p. 174 – 180

Speirs V, Green A. R, White M.C. A comparative study of cytokine gene transcripts in normal and malignant breast tissue and primary cell cultures derived from the same tissue samples. // Int J Cancer. – 1996. – p. 551–556

Vargo-Gogla T., Rosen J. Modelling breast cancer: one size does not fit all // Nature Reviews. 2007. p. 659–672.

К. В. Разум¹, И. А. Пышная¹
С. Ю. Троицкий², Е. И. Рябчикова¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Институт катализа СО РАН

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И НАНОЧАСТИЦ ПАЛЛАДИЯ С ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНОМ УРОВНЕ

Нанотехнологии и наноматериалы стали неотъемлемой частью современной действительности, все глубже вторгаясь во все сферы человеческой деятельности. Широкое применение находят наночастицы золота (НЧЗ), биологическим эффектам НЧЗ посвящены многочисленные исследования и ряд исчерпывающих обзоров, однако механизмы их взаимодействия с клетками не поняты. Между тем, понимание механизмов взаимодействия наночастиц (НЧ) со структурами клетки может открыть новые возможности терапии заболеваний. Актуальной проблемой является потенциальная токсичность НЧ, обнаруживаемых в выбросах заводских труб, котельных, в вулканической пыли и в выхлопных газах автомобилей, с которыми живые организмы сталкиваются ежедневно.

В качестве экспериментальных нано-объектов были выбраны наночастицы золота (НЧЗ), а также наночастицы палладия (НЧП), аналогичные попадающим в атмосферу с выхлопными газами. Первым барьером на пути проникновения НЧ в организм служат эпителиальные клетки, поэтому в качестве экспериментальной модели для исследований взаимодействия НЧ с клетками была выбрана культура клеток MDCK. Другим важным защитным механизмом организма служат макрофаги, в функции которых входит очищение тканей от чужеродных веществ, микроорганизмов, детрита и, в том числе, от НЧ. Для изучения потенциала макрофагов в нейтрализации инородных НЧ металлов была выбрана культура перитонеальных макрофагов.

Цель данной работы: установить механизмы проникновения в клетки наночастиц золота и наночастиц палладия на культуре клеток MDCK и перитонеальных макрофагах *in vitro*; и проследить «судьбу» НЧ в клетках методом электронной микроскопии ультратонких срезов.

В работе были использованы НЧЗ сферической формы (13.40 ± 1.31 нм), синтезированные цитратным методом (Grabar et al. 1995) и НЧП (5.8 ± 1.6 нм), приготовленные в соответствии с синтезом НЧП для каталитических дожигателей выхлопных газов автомобилей, используя жидкофазное восстановление палладия (Троицкий и др. 1995; Симакова и др.

2012). Для работы с культурами клеток НЧ разводили в среде DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки.

Влияние НЧЗ и НЧП на клетки исследовали на культуре первичных перитонеальных макрофагов мышей и на перевиваемой культуре MDCK. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение суток, после чего добавляли НЧ, и инкубировали в течение 10 и 30 мин, 3, 5 и 24 ч. Морфологию монослоя клеток изучали в световом микроскопе Leica DM 2500 со встроенной камерой Leica DFC420 C (Leica, Германия). Взаимодействие НЧ с клетками исследовали посредством анализа ультратонких срезов с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония) с боковой камерой Veleta (SIS, Германия), что позволило одновременно визуализировать НЧ и клеточные структуры, а также изменения, происходящие в клетках.

Результаты

Изучение препаратов культуры MDCK на светооптическом уровне показало нарушение структуры монослоя и «ошаривание» клеток через 24 ч инкубации с *наночастицами палладия*. Культура на покровных стеклах больше напоминала взвесь клеток, чем плотный монослой, характерный для интактной культуры. Уменьшалась площадь цитоплазмы, отмечалась ее вакуолизация и просветление. Анализ ультратонких срезов выявил активную адсорбцию НЧП на поверхности клеток MDCK и их проникновение в клетки уже через 10 мин инкубации. НЧП были обнаружены в различных цитоплазматических органеллах и, в основном, в ядре. Однако, НЧП не выявлялись в структурах, свидетельствующих о проникновении посредством эндоцитоза, например, в клатриновых пузырьках или кавеолах. Пересечение НЧП мембран клеток MDCK нарушало структуру мембран и вызывало повреждение органоидов, которое нарастало по мере инкубации. Проникновение НЧП в клетки MDCK наблюдалось в течение всего периода инкубации; через 24 ч отмечалось накопление НЧП в ядрах клеток и в лизосомах. Возрастало число разрушающихся клеток, в которых происходили обводнение и деструкция органелл, цитозоля и ядра. Проведенное исследование показало выраженное повреждающее действие НЧП на культуру клеток MDCK, очевидно, обусловленное повреждением клеточных мембран.

Иной характер носило взаимодействие *наночастиц палладия* с макрофагами первичной культуры. Оказалось, что макрофаги активно поглощают скопления НЧП путем фагоцитоза (рис. 1А). Внутри макрофагов НЧП обнаруживались в фагосомах на протяжении всего периода инкубации и в лизосомах, начиная с 30 мин инкубации. НЧП выявлялись в эндосомах (рис. 1Б), что свидетельствует о проникновении НЧП путем микроэндоцитоза. В макрофагах, инкубированных с НЧП в течение 5 и 24 ч, скопления НЧ обнаруживались в фаголизосомах и лизосомах; в цитозоле и

ядрах клеток НЧП выявлены не были. Таким образом, НЧП на протяжении 24 ч инкубации с клетками оставались внутри эндоцитозных структур. Макрофаги сохраняли нормальное строение, признаки деструктивных изменений органоидов отсутствовали.

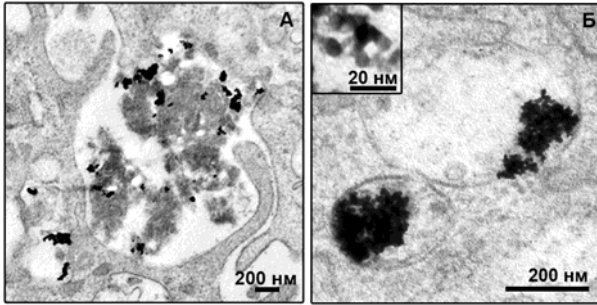


Рис. 1. НЧП в макрофаге.
А – фагоцитоз, Б – эндосомы

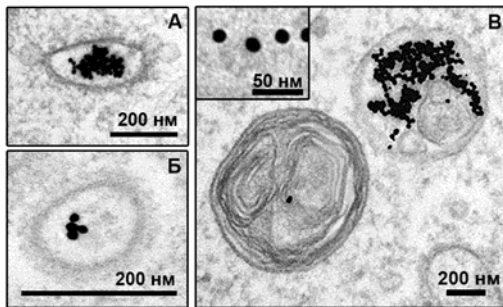


Рис. 2. НЧЗ в кавеоле (А), в «опушенной» везикуле (Б)
и в лизосомах (Б)

Исследование препаратов культуры *MDCK*, инкубированных с наночастицами золота в течение 24 ч, выявило НЧЗ только в эндоцитозных структурах. НЧЗ находились в кавеолах (рис. 2А), что говорит о проникновении НЧ путем кавеолин-зависимого эндоцитоза, а также в макропиносоме, куда они могли попасть посредством макропиноцитоза. Обнаружение НЧЗ в поздних эндосомах и лизосомах, которые являются «конечной станцией» эндоцитоза, указывало на проникновение НЧЗ в клетки путем эндоцитоза. Инкубация клеток *MDCK* с НЧЗ не приводила к их повреждению.

Взаимодействие *наночастиц золота с макрофагами* принципиально не отличалось от взаимодействия НЧП с этими же клетками. Макрофаги активно фагоцитировали НЧЗ, затем НЧЗ обнаруживались в фагосомах и лизосомах. Проникновения НЧЗ в ядро и цитозоль не наблюдалось. Исследование ультратонких срезов выявило НЧЗ также в «опушенных» везикулах (рис. 2Б), что свидетельствует о проникновении наночастиц в эти клетки путем клатрин-зависимого эндоцитоза. В ходе инкубации НЧЗ накапливались в лизосомах (рис. 2В), деструктивные изменения макрофагов отсутствовали.

Таким образом, установлено проникновение НЧП в эпителиальные клетки MDCK путем пересечения плазматической мембраны, а в перитонеальные макрофаги – посредством эндоцитоза. Для НЧЗ обнаружены только эндоцитозные пути захвата этими клетками. Повреждающим действием характеризовались только НЧП в отношении клеток культуры MDCK.

Обсуждение

Проведенное исследование показывает, что НЧП размером 4-6 нм проникают в эпителиальные клетки, непосредственно пересекая плазматическую мембрану, без участия эндоцитозных везикул. Локализация НЧП внутри органелл свидетельствует о способности НЧП пересекать и цитоплазматические мембраны, включая мембраны ядерной оболочки. Данный результат согласуется с представлением о взаимосвязи малого размера НЧ (до 10 нм) и способности НЧ пересекать мембраны и активно проникать в клетки и в ядра. Более крупные НЧЗ (12-14 нм) в те же самые клетки попадают только «законным» способом – в мембранных транспортных пузырьках. Эпителиальные клетки культуры MDCK чувствительны к повреждающему действию НЧП, но не НЧЗ. Аналогичные клетки легких, очевидно, могут повреждаться НЧП, содержащимися в загрязненном воздухе. Макрофаги устойчивы к повреждающему действию НЧП *in vitro*, эту же способность они проявляют и в отношении других НЧ, например, НЧЗ. Макрофаги при взаимодействии с НЧП и НЧЗ сохраняют целостность своих структур и блокируют попавшие внутрь НЧ в мембранных органоидах системы эндоцитоза. Очевидно, такое «поведение» отражает защитные функции макрофагов и свидетельствует об устойчивости их плазматической мембраны к воздействию НЧП. Можно предположить, что макрофаги легких могут элиминировать скопления НЧП, попавших с вдыхаемым воздухом, и таким образом предупреждать повреждение эпителиальных клеток.

Заключение

Наночастицы палладия оказываются в органеллах, цитоплазме и ядре клеток MDCK путем непосредственного пересечения клеточных мембран, вследствие чего развиваются деструктивные изменения клеток. В культуре

макрофагов НЧП активно элиминируются из межклеточной среды посредством фагоцитоза и микроэндоцитоза, и сохраняются в специализированных структурах (лизосомах). Механизмы поглощения НЧЗ макрофагами не ограничиваются только фагоцитозом и макропиноцитозом: имеет место и клатрин-зависимый эндоцитоз. Различный характер взаимодействия НЧП с эпителиальными клетками и макрофагами, по-видимому, связан с их морфофункциональными особенностями.

Список литературы

Поletaева Ю.Е., Разум К.В., Пышная И.А., Марченко А.К., Пышный Д.В., Зенкова М.А., Рябчикова Е.И. Взаимодействие наночастиц золота с эукариотическими клетками в культуре и в условиях организма // Нанотехнологии и охрана здоровья, 2014, Т. 6, №1, С. 36-46.

Inna A. Pyshnaya, Kristina V. Razum, Julia E. Poletaeva, Dmitrii V. Pyshnyi, Marina A. Zenkova, and Elena I. Ryabchikova. Comparison of behaviour in different liquids and in cells of gold nanorods and spherical nanoparticles modified by linear polyethyleneimine and bovine serum albumin. BioMed Res Int, 2014, V.2014, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/908175>.

А. О. Соловьева^{1,2}, **К. Э. Зубарева**^{1,3}
А. Ф. Повещенко^{1,2}, **Е. А. Нечаева**³

¹ *Институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН*

² *Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина*

³ *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Миграционная активность трансплантированных клеток играет ключевую роль для эффективности клеточной терапии. Целью данного исследования стало изучение влияния опухолевого роста на распределение трансплантированных клеток костного мозга в организме реципиента.

Для исследования влияния роста опухоли мы сравнивали распределение трансплантированных клеток у мышей линии C57Bl с привитой меланомой B16 и у интактных мышей той же линии. Для этого животные были разделены на 4 группы случайным образом. Прививка опухоли меланомы

В16 животным первой и второй групп производилась путём подкожного введения. Третья и четвертая группы – интактные животные. Всем животным внутривенно вводили ММСК (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга) либо ККМ (нефракционированный костный мозг) самцов, соответственно, через 3 суток после прививки опухоли. Мышей забивали методом дислокации шейного отдела позвоночника через 7 и 14 суток после трансплантации клеток. Для исследования забирали органы: легкие, кожу; опухоль и околоопухолевые ткани; лимфоузлы; сердце; печень; селезенку; костный мозг; головной мозг. ДНК из выделенных органов анализировали на содержание Y-позитивных клеток при помощи ПЦР в реальном времени.

Максимальное количество Y-позитивных клеток через неделю после введения МСК/ККМ обнаружено в костном мозге мышей – носителей меланомы В16. При этом количество трансплантированных клеток в костном мозге мышей-опухоленосителей было достоверно выше по сравнению с костным мозгом интактных животных.

Через 2 недели после трансплантации МСК/ККМ также максимальное количество трансплантированных клеток детектировано в костном мозге мышей – носителей опухоли по сравнению со здоровыми животными.

Возможно, данная особенность распределения трансплантированных клеток в организме животных с привитой меланомой В16 связана с диссеминированными опухолевыми клетками в костном мозге, которые стимулируют миграцию введенных клеток.

**Н. В. Зубенко, И. С. Коротецкий
С. В. Шилов, Л. В. Иванова**

*АО «Научный центр противоинфекционных препаратов»,
г. Алматы, Казахстан*

АДАПТАЦИЯ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА С РАЗЛИЧНОЙ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРОЙ К КОММЕРЧЕСКИМ АНТИВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Вирусы гриппа А по-прежнему являются основной причиной возникновения крупных эпидемий, сопровождающихся высокой смертностью.

Ввиду непредсказуемости молекулярно-генетических и иммунологических характеристик новых эпидемических и пандемических штаммов вируса гриппа А, защита, обеспечиваемая вакцинацией, не является достаточно надежной, и химиотерапия сохраняет свою актуальность [1]. В современной терапии и профилактике гриппа используются селективные противовирусные препараты: блокаторы M2 каналов – препараты адамантанового ряда (ремантадин, амантадин), и ингибиторы нейраминидазы – занамивир, озельтамивир.

Однако из-за широкого и нерационального использования амантадина в течение последних нескольких десятков лет, начиная с сезона 2003 – 2004 гг. доля резистентных вирусов к адамантанам резко возросла. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США), доля устойчивых вирусов увеличилась с 0,4 % в 1994–1995 гг. до 12,3 % в 2003 – 2004 гг. В 2008 – 2009 гг. все протестированные изоляты вируса гриппа подтип А/Н3N2 и А/Н1N1 оказались резистентными к адамантанам [2]. Согласно литературным данным, у штаммов гриппа, резистентных к адамантанам, возникают точечные замены в трансмембранной части домена белка M2 в позициях 26, 27, 30, 31 или 34 [3].

Похожая ситуация произошла и с препаратами «второго поколения» – озельтамивир (Tamiflu) и занамивир (Relenza) после введения их в широкую практику в 1999 году. Первоначально случаи появления резистентных штаммов с маркерными мутациями устойчивости к озельтамивиру (E119V, R292K, H275Y, N294S) и занамивиру (Q136K), как правило, были связаны с проводимым курсом лечения и встречались довольно редко – 1-3% случаев в год [4]. Однако в 2007 – 2008 гг. появились сообщения из многих стран мира об устойчивости циркулирующих штаммов вирусов гриппа А/Н1N1 к озельтамивиру (мутация H275Y). Причем большинство лиц, инфицированных резистентными штаммами, ранее препаратом не лечились.

В 2008–2009 гг. уже 99,5 % протестированных изолятов вирусов гриппа А/Н1N1 оказались резистентными к озельтамивиру [2].

Эффективность химиотерапии вирусов гриппа во многом зависит от решения проблемы резистентности.

С целью изучения мутационных процессов лежащих в основе формирования лекарственной устойчивости и поиска механизмов ее преодоления, проведена адаптация штаммов вируса гриппа с различной антигенной структурой к коммерческим противовирусным препаратам.

Методы исследования: В работе использовали штаммы вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/H1N1.

В исследованиях использовали 2 коммерческих противовирусных препарата: Ремантадин (производство АО «ОЛАЙНФАРМ», LV-2114, Латвия) и Тамифлю (производство Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария).

Эксперименты проводили на перевиваемой монослойной культуре клеток MDCK (Madin Darby Canine Kidney).

Оценку цитотоксического действия исследуемых веществ проводили, при помощи МТТ-теста. Учет данных осуществляли после 72 часов воздействия исследуемыми препаратами.

Оценку противовирусной активности диких и мутантных штаммов вируса гриппа А проводили по терапевтической схеме. Клетки заражали вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀/0,2 мл. В эксперименте использовали 5 концентраций, полученных путем двукратных разведений начиная от 1/2 значения ЦТК₅₀.

Для получения мутантных штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1), штаммы дикого типа пассировались на культуре клеток с постоянным содержанием тамифлю или ремантадина, постоянно увеличивая концентрации противовирусных препаратов.

Для подтверждения того, что полученные мутанты вируса гриппа А обладают устойчивостью к препаратам тамифлю и ремантадин была проведена оценка их фенотипической устойчивости. Изучение фенотипических характеристик мутантов выполняли в культуре клеток в присутствии 6 различных концентрации исследуемых препаратов. Критерием резистентности считали наличие различия титра вируса в РГА в сравнении с дикими штаммами вируса гриппа А обработанными теми же концентрациями исследуемых веществ.

Для подтверждения того, что фенотипическое проявление устойчивости к противовирусным препаратам у мутантных штаммов обусловлено специфическими заменами в нуклеиновых кислотах (НК), нами было проведено ПЦР с последующим секвенированием участков генов NA и M, ответственных за резистентность к препаратам тамифлю и ремантадин соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Для получения данных рас-

считывали среднее арифметическое, среднеквадратичное отклонение. Достоверность отличия средних значений проверяли по t-критерию Стьюдента (уровень значимости $p \leq 0,05$).

Результаты: Для изучения формирования молекулярных основ лекарственной устойчивости штаммов вируса гриппа А к противовирусным препаратам *in vitro* нами были выбраны 2 коммерческих противовирусных препарата ремантадин и тамифлю.

В результате проведенных исследований были определены значения ЦТК₅₀ препаратов тамифлю и ремантадин на культуре клеток MDCK, которые составили 0,3 мг/мл и 0,1 мг/мл соответственно.

Опираясь на результаты, полученные при оценке значений ЦТК₅₀, была изучена противовирусная активность тамифлю и ремантадина в отношении диких штаммов вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/H1N1. В ходе проведенного эксперимента было продемонстрировано, что исследуемые коммерческие противовирусные препараты обладают противовирусной активностью в концентрациях от 0,3 до 0,009 мг/мл (тамифлю) и от 0,1 до 0,0031 мг/мл (ремантадин) так как в данных концентрациях наблюдалось 50–70% ингибирование репродукции вирусов по сравнению с контролем.

В дальнейших экспериментах проводили 12–15 последовательных пассажей в культуре клеток в присутствии возрастающих концентраций тамифлю (от 0,009 до 0,3 мг/мл) и ремантадина (от 0,0031 до 0,1 мг/мл).

По окончании селективного пассирования штаммов вируса гриппа А, для подтверждения получения резистентных форм был проведен сравнительный анализ фенотипической устойчивости полученных мутантов и штаммов дикого типа в отношении противовирусных препаратов тамифлю и ремантадин. Данные оценки фенотипической устойчивости представлены на рисунке 1.

Как видно из представленных на рисунке 1 данных, нами были получены устойчивые к тамифлю и ремантадину штаммы вируса гриппа А/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/H1N1. Титр мутантов в РГА достоверно отличается от титра штаммов дикого типа.

В дальнейшем для подтверждения того, что фенотипическое проявление устойчивости к противовирусным препаратам у мутантных штаммов обусловлено специфическими заменами в НК, нами было проведено секвенирование участков генов NA и M, ответственных за резистентность к препаратам тамифлю и ремантадин соответственно.

Анализ аминокислотных последовательностей показал, что в структуре M2 белка мутантного штамма FPV_RRim_H7N7 произошла замена S31N, а у мутанта Swine_RRim_N1H1 была выявлена замена в положении A30T, ответственных за развитие устойчивости к препарату ремантадин.

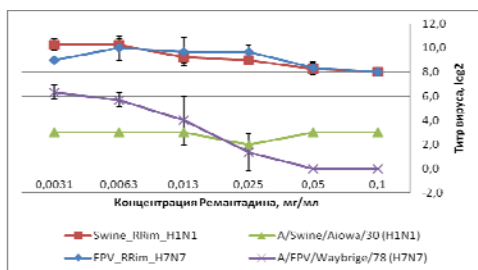
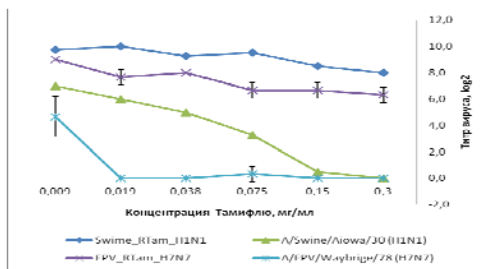


Рис. 1. Результаты сравнительного анализа фенотипической устойчивости полученных мутантов и исходных штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/N1H1 в отношении препаратов тамифлю и ремантадин

Кроме этого в строении аминокислотной последовательности белка M1 мутантных штаммов устойчивых к тамифлю произошла специфическая замена в позиции N207S. По-видимому, данная мутация имеет селективное значение в устойчивости к препарату тамифлю.

Анализ белка NA выявил специфическую мутацию H274Y отвечающую за резистентность к препарату тамифлю у мутантов FPV_RTam_H7N7 и Swine_RTam_N1H1.

Выводы: Адаптация штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/N1H1 в культуре клеток MDCK к тамифлю произошла за 15 последовательных пассажей с постоянным содержанием и увеличением концентрации препарата от 0,009 до 0,3 мг/мл. Адаптация штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78/H7N7 и A/Swine/Iowa/30/N1H1 к ремантадину произошла в течение 12 и 15 последовательных пассажей в тех же условиях (концентрация препарата от 0,1 до 0,0031 мг/мл). Анализ SNP показал наличие маркеров резистентности к ремантадину в структуре M2 белка мутантных штаммов FPV_RRim_H7N7 и Swine_RRim_N1H1: S31N и A30T соответственно, и дополнительно была обнаружена специфическая мутация в позиции N207S в M1 белке. По-видимому, данная специфическая мутация имеет селективное значение в устойчивости к препарату тамифлю. При анализе SNP, в белке NA, была выявлена специфическая мутация H274Y у обоих мутантов FPV_RTam_H7N7 и Swine_RTam_N1H1 резистентных к тамифлю.

Список литературы

Матусевич, О.В. Синтез и изучение фрагментов РНК-полимеразы вируса гриппа А: диссертация – СПб, 2013 – 127 с.

Чернова, Т. М., Тимченко В.Н. Противовирусные препараты и лечение гриппа // Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал – 2011. Т. 64, № 1: с. 10 – 14.

Mayers, L. D. (Ed.) Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects – NY: Humana Press, Vol. 2 – 2009, 1370 p.

Силуянова, Э. В. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа А(Н3N2) и В в период 2003-2013 гг. в РФ: автореф. дис. – Москва, 2014 – 167 с.

**Н. Г. Кливлеева, Т. И. Глебова
Т. В. Кузнецова, М. Г. Шаменова**

*РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии»
КН МОН РК, г. Алматы*

**ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ
ГРИППА А/АЛМАТЫ/5/98 (H1N1)**

Ежегодно вирусы гриппа вызывают эпидемические подъемы заболеваемости в различных регионах Казахстана, России и в мире. Спектр эпидемических штаммов и их характеристика варьируют в зависимости от сезонов. В условиях наблюдающейся в последние годы социркуляции вирусов гриппа подтипов А(H1N1), А(H3N2) и типа В остро стоит вопрос о постоянном надзоре за гриппом. Ранняя дифференциальная диагностика гриппа с лабораторной расшифровкой этиологии заболеваний с применением специфичных и высокочувствительных методов определяет тактику противовирусной терапии. В настоящее время для идентификации возбудителя гриппа наиболее широко используют методы, основанные на выявлении антигенов вирусов гриппа. Достигается это за счет современных тест-систем, которые базируются на использовании моноклональных антител (МКА) к определенным антигенным детерминантам вируса [Соминина А.А. и др., 2007]. Целью настоящей работы являлось получение МКА к казахстанскому штамму вируса гриппа А/H1N1.

После бустер-иммунизации, слияния и первичной гибридизации получено семь антителпродуцирующих клонов, активно реагировавших в ИФА с антигенами вируса гриппа А/Алматы/5/98 (H1N1) и не взаимодействовавших с препаратами гетерологичных вирусов гриппа человека. Положительные специфически реагирующие гибриды клонировали дважды мето-

дом лимитирующих разведений. После первого клонирования антителпродукцию сохранили пять клонов, второго – лишь два (МКА 5C₃ и 4F₂).

В результате тестирования в непрямом варианте ИФА установлено, что оба МКА взаимодействовали с вирусами гриппа H1N1: A/Solomon Islands/03/06, A/New Jersey/8/76, A/Swine/Hong-Kong/1/74 и A/Swine/Iowa/15/30. Перекрестного реагирования с другими субтипами вирусов гриппа А, включая штаммы сезонного гриппа А(H1N1), А(H3N2) и возбудителя пандемии «азиатского» гриппа А(H2N2) 1957 г., выявлено не было. Полученные МКА не взаимодействовали также с вирусами гриппа В Викторианской и Ямагатской линий. Изучение спектра реактивности полученных МКА со свинными вирусами и вирусами человека свиного происхождения разных лет выделения позволяет сделать вывод о том, что МКА направлены к высококонсервативной детерминанте молекулы НА. Полученные результаты позволяют предположить, что МКА имеют ценные иммунологические характеристики и не потеряют своей диагностической актуальности.

Таким образом, МКА могут использоваться в создании тест-систем для детекции вирусных антигенов, а также углубленного изучения механизмов изменчивости и антигенной характеристики новых пандемических вирусов.

**С. А. Клотченко, А. С. Тараскин, М. А. Плотнокова
В. В. Егоров, А. А. Шалджян, А. В. Васин**

Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России

ПРИМЕНЕНИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В ФОРМАТЕ МИКРОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ТИПИРОВАНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ЧЕЛОВЕКА *

Вирус гриппа ежегодно несёт огромную угрозу населению многих стран. Последствия заболевания гриппом в случае возникновения новых пандемий могут приводить к летальным исходам. Однако даже в случае обычных сезонных эпидемий уровень заболеваемости достаточно высок как среди детей и людей пожилого возраста, так и среди взрослого трудоспособного населения.

* Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации для молодых учёных и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (№ СП-6549.2013.4).

Вирусы гриппа (ВГ), принадлежащие к семейству ортомиксовирусов, подразделяются на три типа: А, В и С. Типирование ВГ проводят на основе серологических отличий NP и М белков. Наибольшую опасность с эпидемиологической точки зрения представляют вирусы гриппа типа А (ВГА), субтипирование которых проводится на основе антигенных свойств поверхностных гликопротеинов – гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА).

Несмотря на то, что в научной литературе предложено огромное число методов выявления ВГ, проблема его точной диагностики всё ещё далека от решения. Более того, услуги молекулярной диагностики недоступны для большого числа пациентов даже в экономически развитых странах, что приводит к частым случаям неправильной постановки диагноза при гриппе. В настоящее время для типирования и субтипирования ВГ наиболее часто используют методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также иммунофлуоресцентного или иммуноферментного анализов (ИФА). Как правило, ИФА является более простым для выполнения, доступным и дешёвым способом диагностики гриппа, чем ПЦР. Однако данный подход имеет ряд существенных недостатков, в том числе обладает не самой высокой чувствительностью, ограниченным числом одновременно определяемых в одной пробе антигенов, высокой продолжительностью анализа, а также большим расходом реагентов, в частности, дорогостоящих моноклональных антител (МКА). Большинство этих недостатков лишён метод биологических белковых микрочипов, работающий по принципу «сэндвич»-метода твердофазного иммуноанализа и позволяющий проводить одновременный количественный анализ специфических взаимодействий десятков молекул в одной реакции с минимальными затратами реагентов и сокращённым временем проведения анализа.

Существует несколько форматов проведения анализа с помощью микрочипов, позволяющих выявлять специфические вирусные антигены, либо вырабатываемые организмом противовирусные антитела. Для выявления ВГ в составе исследуемой пробы мы выбрали формат проведения реакции, при котором иммобилизованные на чипе МКА связывают вирусные антигены в составе белковой пробы, а детекцию взаимодействия проводят с помощью дополнительных меченых МКА. По сути, данный метод является двухстадийным «сэндвич»-вариантом твердофазного ИФА, обладающего наиболее высокой чувствительностью, что чрезвычайно важно для детекции вирусных белков, которые нужно выявлять в малых, вплоть до фемтомольных, концентрациях.

Целью данной работы явилось создание лабораторного образца биочипа для определения и типирования ВГ человека с помощью МКА к вирусному нуклеопротеину (NP), который не уступал бы по чувствительности и

специфичности традиционному методу ИФА. Для осуществления данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить специфичность моноклональных антител к белку NP вируса гриппа типа А и В с помощью метода ИФА.
- 2) Разработать методику выявления и типирования вирусов гриппа А и В с использованием белкового микрочипа.
- 3) Сравнить чувствительность и специфичность методов ИФА и белкового микрочипа.

Для печати белковых микрочипов использовали слайды с поли-L-лизиновой подложкой. Для изготовления слайдов чистые микробиологические стёкла FisherFinest Premium ("Fisher Scientific", США) промывали Milli-Q H₂O и инкубировали в течение 5 мин в 0,01 % растворе поли-L-лизина ("Sigma-Aldrich", США), приготовленном на Milli-Q H₂O. Затем стёкла высушивали при 60 °C в течение 1 часа. Чистые приготовленные слайды хранили не более недели при комнатной температуре.

МКА иммобилизовали на полилизинные слайды методом контактной печати на споттере SpotBot 3 ("Arrayit Corporation", США) с использованием иглы 946MP4 ("Telechem", США) при поддержании уровня относительной влажности 55–60 % и температуре 18–22 °C. После печати слайды оставляли на ночь в споттере при тех же условиях. Готовые микрочипы хранили при комнатной температуре не более месяца.

Все этапы инкубации проводили в объёме 100 мкл при температуре 25 °C в условиях перемешивания при 250 об/мин на термошейкере для планшетов Biosan PST-60 HL plus ("BioSan", Латвия) в рамках для гибридизации на 16 субэппеев FAST Frame ("Whatman", США).

Анализ с использованием созданного биочипа осуществляли в четыре этапа. Вначале во избежание возможного неспецифического связывания поверхность микрочипа блокировали раствором 1 % BSA на 1-кратном PBS в течение 30 мин. Затем проводили инкубацию биочипа с исследуемыми пробами, полученными серией разведений на блокирующем растворе, в течение часа. Далее для детекции специфического связывания слайд инкубировали в течение 30 мин со смесью биотинилированных антител в блокирующем буфере. Биотинилированные МКА визуализировали окрашиванием зреев флуоресцентным реагентом Cy3-стрептавидин ("Invitrogen", США), разведённым в соотношении 1:500 в блокирующем буфере, в течение 15 мин.

Результаты гибридизации регистрировали путём сканирования микрочипа на сканере ScanArray Express ("PerkinElmer", США) с разрешением 5 мкм и значением PMT 90. Дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программ ScanArray Express v.3.0, Microsoft Office Excel 2003/2007 и GraphPad Prism 6.

Для иммунологического типирования вирусов гриппа А и В человека в качестве тип-специфического антигена был выбран белок NP. В качестве первых антител использовали МКА «6D11» (получены в Лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России) и «IA108» («Биалекса», Москва) к белку NP ВГА, а также МКА «2/3» (получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России) и «IB12» («Биалекса», Москва) к белку NP вируса гриппа В. В качестве выявляющих антител использовали коммерческие биотинилированные антитела «IA245» и «IB64» («Биалекса», Москва) к белкам NP вирусов гриппа А и В, соответственно, а также немодифицированные антитела «6D11», «IA108», «2/3» и «IB12», указанные выше, которые конъюгировали с биотином с использованием коммерческого набора для биотинилирования EasyLink Biotin (type A) Conjugation Kit ($3 \times 100 \mu\text{g}$ Biotin) (“Abcam”, США).

В качестве контрольных антигенов в работе использовали штаммы вирусов гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Solomon Islands/03/06 (H1N1), A/Brisbane/59/07 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), B/Brisbane/60/90 и B/Massachusetts/2/12. Концентрацию тотального белка в вирус-содержащих пробах и образцах МКА определяли модифицированным методом Лоури.

Для проведения оценки возможности и целесообразности использования технологии белковых микрочипов при диагностике гриппа подготовили тестовые партии биочипов, представляющих собой иммобилизованные методом контактной печати на полилизиную подложку МКА, специфически выявляющие белки NP вирусов гриппа А и В человека в разных концентрациях. Каждый слайд состоял из 16-ти идентичных массивов точек диаметром около 100 нм, содержащих представленные в трёх повторностях образцы МКА к NP, а также контрольные точки.

В каждую из ячеек последовательно добавляли контрольные вирусные лизаты в разных разведениях. Было показано, что иммобилизованные на модельном микрочипе МКА к белку NP специфически выявляли соответствующие вирусные лизаты. На основании полученных данных было определено, что иммобилизуемые на чипе МКА следует использовать в концентрациях от 100 до 200 мкг/мл, оптимальная концентрация выявляющих МКА при этом составляет 1 мкг/мл. Значения концентраций выявляемых проб составляют 10-100 нг/мл (по тотальному белку). Неспецифического, а также перекрёстного связывания между МКА к вирусам гриппа А и В не выявили. Впоследствии для работы могут быть использованы оптимально работающие пары МКА «6D11» и «IA245» для ВГА и «2/3» и «IB64» для вируса гриппа В.

В работе было показано, что разработанный тестовый образец иммунологического биочипа для выявления и типирования вирусов гриппа А и В

обладает чувствительностью и специфичностью, сопоставимыми с методом ИФА. По результатам выполнения работы сделали вывод о принципиальной возможности использования метода аналитических белковых биочипов для выявления и типирования вирусов гриппа А и В с помощью МКА. В настоящее время проводится работа по выбору МКА, позволяющих не только типировать вирусы гриппа А и В человека, но и определять подтипы вируса гриппа А (H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H7N9 и H9N2).

М. А. Плотникова, С. А. Клотченко, А. В. Васин

Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ A549 НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИИ И НА УРОВНЕ ТРАНСЛЯЦИИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ ГРИППА ТИПА А *

Грипп – это острая респираторная вирусная инфекция, вызывающая сезонные эпидемии и периодические пандемии с высокой степенью летальности. Основными мишенями вирусов гриппа являются эпителиальные клетки дыхательных путей и макрофаги (моноциты). Защитные механизмы эпителиальных клеток, поражённых вирусами гриппа типа А, направлены в первую очередь на ограничение дальнейшего распространения инфекции. В частности, в ответ на вирусное заражение в клетках активируются транскрипционные факторы, приводящие к экспрессии генов хемокинов (RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3 и IP-10), противовирусных (IFN- α/β) и провоспалительных (IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF- α) цитокинов.

Экспрессия генов большинства цитокинов не является конститутивной, и при инфицировании вирусами гриппа в клетках различного происхождения может наблюдаться синтез тех или иных цитокинов и хемокинов в самых различных сочетаниях и соотношениях. Кроме того, уровни экспрессии и профили цитокинов, индуцированных разными штаммами вирусов гриппа, также могут отличаться.

В представленной работе были исследованы профили экспрессии генов цитокинов в клетках A549 (карцинома лёгких человека), инфицированных штаммом гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09) в дозе 1 MOI. Паттерны

* Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации для молодых учёных и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (№ СП-1580.2012.4).

экспрессии цитокинов определяли через 8, 24 и 48 часов после заражения. Репликация вируса A/California/07/09 в клетках A549 была подтверждена методом ПЦР.

Уровень мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α измеряли методом мультиплексной ПЦР. Количество секретируемых клетками белков IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α оценивали во внеклеточной среде с помощью белкового микрочипа. Обе мультиплексные тест-системы были разработаны в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Как в инфицированных, так и в незаражённых клетках A549 выявили мРНК IL-1 β , IL-6 и IL-18. Заражение клеток вирусом A/California/07/09 приводило к значительному (примерно в 100 раз) увеличению числа транскриптов IL-1 β через 24 и 48 часов. На всех сроках после заражения по сравнению с контрольными клетками наблюдали незначительное (в 2–3 раза) повышение уровня мРНК IL-6. Уровень мРНК IL-18 в контрольных и заражённых клетках не изменялся.

Вирус A/California/07/09 индуцировал в клетках A549 образование мРНК IL-4, IL-10 и TNF- α , не выявляемых в контрольных клетках. Через 8 часов после заражения наблюдали максимальные уровни мРНК IL-4 и TNF- α , после чего происходило их плавное снижение. мРНК IL-10 детектировали через 8 часов после инфицирования, через 24 часа наблюдали максимум его экспрессии, а к 48 часам происходило снижение уровня мРНК.

Во внеклеточной среде, полученной от анализируемых клеток, с использованием белкового микрочипа также оценили продукцию секретируемых клетками A549 цитокинов. Во внеклеточной среде выявляли только TNF- α и IL-8. Секрецию IL-8 наблюдали как в случае контрольных, так и инфицированных вирусом клеток. При заражении наблюдали плавное двукратное (по сравнению с контролем) повышение уровня IL-8 через 24 и 48 часов. Уровень IL-8 через 8 часов после заражения был сравним с количеством IL-8 во внеклеточной среде контрольных клеток. К сожалению, сопоставить количество белка IL-8 с уровнем кодирующей его мРНК не представлялось возможным, так как используемые нами тест-системы для определения экспрессии цитокинов на уровне мРНК не включали IL-8.

Через 24 часа после заражения вирус A/California/07/09 индуцировал секрецию TNF- α , которую не наблюдали ни через 8, ни через 48 часов после заражения. При этом максимальный уровень мРНК TNF- α в клетках наблюдали через 8 часов после заражения вирусом.

Представленные данные дают основание полагать, что при заражении клеток A549 вирусом A/California/07/09 происходит регуляция уровня цитокинов на различных этапах экспрессии гена. В частности, несмотря на то, что в клетках выявляли мРНК цитокинов IL-4 и IL-10 на всех сроках

после заражения, во внеклеточной среде не было обнаружено соответствующих белковых продуктов. Это может быть связано с тем, что происходит блокирование трансляции и/или секреции цитокинов. Мы не проводили измерение внутриклеточного уровня IL-4 и IL-10, поэтому нельзя точно сказать на какой из стадий происходит блокирование образования и транспорта цитокинов во внеклеточную среду. В свете полученных результатов проведение исследований в данном направлении будет продолжено.

**В. Н. Сухоруков, М. В. Сергеева
Л. А. Степанова, Л. М. Цыбалова**

Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России

КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФЛАГЕЛЛИНА И ЭПИТОПОВ НА2 ДЛЯ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Введение. В последнее время применяются новые подходы в создании вакцин против гриппа, такие как разработка векторных вакцин, ДНК-вакцин и рекомбинантных вакцин. Консервативные белки вируса гриппа А (М2, НА2, М1, NP) являются объектом разработки рекомбинантных вакцин широкого спектра действия, направленных на заболевания, вызванные вирусами разных подтипов, в том числе потенциально пандемическими.

Гемагглютинин вируса гриппа – гомотримерная молекула, состоящая из глобулярной части НА1субъединицы и стеблевого домена, состоящего из части НА1 и целого домена НА2 субъединицы (Wilson et al., 1981). НА1 содержит высоко вариабельную область, тогда как последовательность субъединицы НА2 достаточно консервативна. Субъединица НА2 имеет до 85% гомологии последовательности среди разных подтипов и 95% гомологии среди штаммов одного подтипа (Fouchier et al., 2005). По этой причине субъединица НА2 является перспективной мишенью для создания рекомбинантных эпитопных вакцин.

Главным преимуществом рекомбинантных эпитопных вакцин является иммунизация минимальными структурами, иммуногенность и антигенность которых охарактеризована. Вместе с тем, использование небольших молекул, создает проблему низкой иммуногенности по сравнению с мультиэпитопными белковыми антигенами. Однако их иммуногенность может быть усилена присоединением к высокоиммуногенному носителю, а также использованием адъювантов. Таким носителем и, одновременно, адъювантом для разработки рекомбинантных вакцин для защиты от разнообразных патогенов вирусного и бактериального происхождения является флагел-

лин. Флагеллин, белок из которого состоит жгутик бактерий, является сильным адьювантом при парентеральном, подкожном и мукозальном введении (Lee et al., 1999; Bates et al., 2009). С и N-концевые консервативные участки домена D1 флагеллина связываются с лейцин богатыми повторами Toll-like рецептора 5 (TLR5) (Smith et al., 2003), индуцируя эффекторы врожденного иммунитета (Hayashi et al., 2001).

Ранее нами был сконструирован гибридный рекомбинантный белок (FlgHA2m), содержащий присоединенные к С-концу флагеллина перспективные эпитопы HA2 (малая α -спираль, два консервативных участка консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа A/H2N2). Экспрессированный в *E. coli*, белок FlgHA2m, был использован для создания прототипа противогриппозной вакцины широкого спектра действия, которая защищала мышей от летальной инфекции вирусами гриппа A/H2N2 и вызывала образование антител, кросс-специфичных к вирусам гриппа А филогенетической группы I, включающей вирусы субтипов A/H1N1, A/H2N2, A/H5N1. Однако, для эффективной стимуляции вирус-специфичных антител была необходима четырехкратная иммунизация мышей, что могло быть связано с несбалансированным ответом на небольшой целевой антиген (HA2m) и носитель (Flg), имеющий высокую молекулярную массу.

Соответственно, **целью настоящей работы** было создание конструкций, кодирующих гибридный белок, содержащий HA2m, присоединенный к укороченному флагеллину с удаленными вариabельными доменами (FlgsHA2m), а также отдельные рекомбинантные белки Flgi HA2m для оценки соотношения и эффективности образования антител к целевому антигену и носителю.

Материалы и методы. Для построения карт экспрессионных векторов, подбора рестриктаз и праймеров использовали программное обеспечение Vector NTI v10.0 (Invitrogen, США). Экспрессионные конструкции создавали на основе плазмиды pQE30/FlgHA2m (рис. 1). Для создания FlgsHA2m флагеллин укорачивали вырезанием участка нуклеотидной последовательности, кодирующей домены D3, D2 и небольшую часть D1 по сайтам эндонуклеазы рестрикции ClaI (рис. 1, 2). Для создания Flgi HA2m соответствующие фрагменты амплифицировали с использованием праймеров, несущих концевые сайты рестрикции BamHI и HindIII и затем встраивали в мультиклональный сайт вектора pQE30 (рис. 1).

Бактериальные штаммы *E. coli* DLT1270 трансформированные вектора мир QE30/FlgsHA2m, pQE30/Flg и pQE30/HA2m накапливали в среде LB с ампициллином, с последующим запуском экспрессии белка с помощью 1 mM IPTG или 0,2% лактозы. Уровень экспрессии белков анализировали методом электрофореза в ПААГ. Для моделирования трехмерной структуры белков по первичной последовательности использовали откры-

тый веб-ресурс Phyre2 (Kelley, Sternberg, 2009). Визуализацию трехмерной структуры белков выполняли в программе Chimera 1.5.3 (Pettersen et al., 2004).

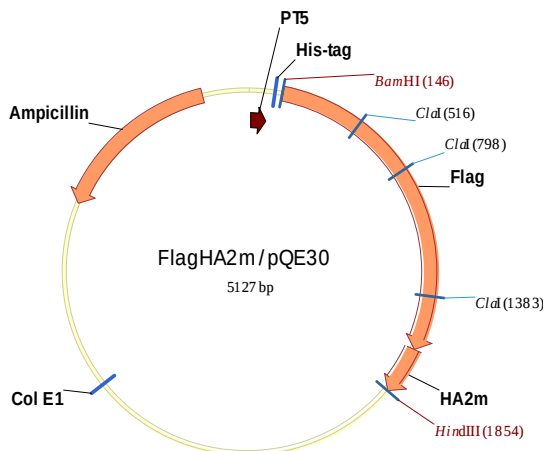


Рис. 1. Структура вектора pQE30, кодирующего белок FlgHA2m. BamHI, HindIII – сайты клонирования белка FlgHA2m в мультиклональный сайт. Clal(798), Clal(1383) – область, вырезанная для получения укороченного белка FlgsHA2m. ColE1 – ориджин репликации. PT5 – T5 промотер

Результаты и обсуждение. Для создания конструкции с укороченным флагеллином FlgsHA2m из флагеллина нами были удалены гипервариабельные домены D2 и D3, а также небольшая часть α -спиралей домена D1 (рис. 2, 4), так как известно, что эти участки не участвуют во взаимодействии с рецептором TLR5 (Smith et al., 2003) и при их удалении сохраняются адьювантные свойства флагеллина (Lui et al., 2011). В результате экспрессии этой конструкции в клетках *E. coli* штамма DLT1270 был получен белок с ожидаемой молекулярной массой 41,5 кДа.

С целью изучения образования антител к носителю-флагеллину в составе противогриппозной вакцины на основе белка FlgHA2m был создан экспрессионный вектор pQE30/Flg, при экспрессии которого в штамме *E. coli* DLT1270 получался белок с нужной молекулярной массой 52,9 кДа, соответствующей предсказанной для флагеллина (рис. 3А, 4). Для того чтобы оценить образование антител к гемагглюнину, способом аналогичным для флагеллина, нами был получен вектор pQE30/HA2m и наработан белок HA2m с ожидаемой молекулярной массой 9,8 кДа (рис. 3Б, 4).

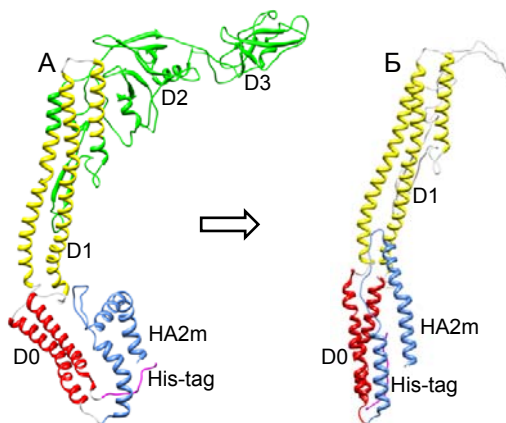


Рис. 2. Трехмерные модели рекомбинантных белков. **А** – исходный рекомбинантный белок FlgHA2m; **Б** – укороченный рекомбинантный белок FlgsHA2m. Зеленым отмечена вырезанная область (домены флагеллина D2 и D3 и небольшая часть α -спиралей домена D1), желтым – домен флагеллина D1, красным – домен флагеллина D0, синим – последовательность HA2(35-102), фиолетовым – гистидиновый тег.

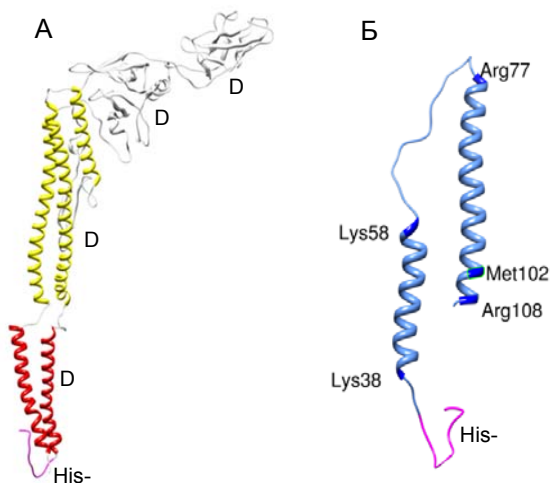


Рис. 3. **А.** Трехмерная модель белка флагеллина. Синим отмечена последовательность HA2, фиолетовым – гистидиновый тег.

Б. Трехмерная модель фрагмента гемагглютинаина HA2m. Синим отмечена последовательность HA2, фиолетовым – гистидиновый тег.

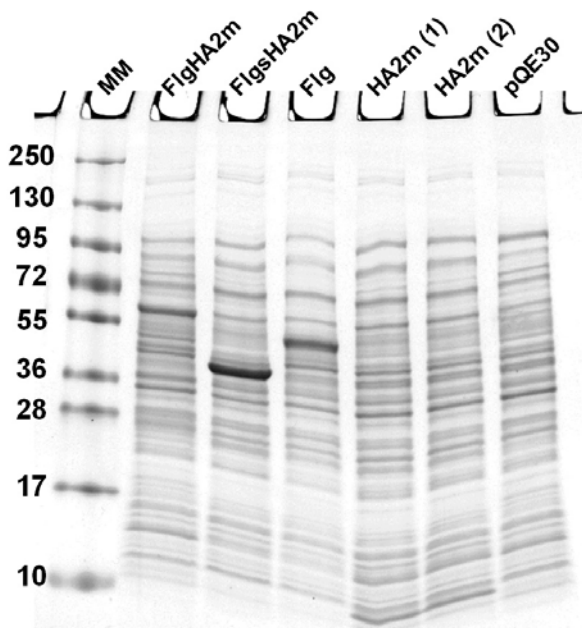


Рис 4. Экспрессия гибридных белков в клетках E.coli DLT1270. MM – маркер молекулярного веса (кДа). FlgHA2m, FlgsHA2m, Flg, HA2m – лизат клеток, трансформированных вектором pQE30 с соответствующей вставкой. pQE30 – лизат клеток, трансформированных вектором pQE30 без вставки

Закключение. Созданный нами гибридный белок FlgsHA2m с укороченным флагеллином может служить основой для разработки вакцины против вирусов гриппа А филогенетической группы I. Использование этого белка приведет к более сбалансированному ответу на составляющие его антигены. Полученные нами отдельные рекомбинантные белки Flg и HA2m позволят установить соотношение и эффективность образования антител к целевому антигену и носителю в противогриппозных вакцинах на основе гибридных белков, содержащих участок гемагглютинаина HA2, присоединенный к полноразмерному и укороченному флагеллину.

**С. В. Шилов, И. С. Коротецкий
Н. В. Зубенко, Л. Н. Иванова**

*АО «Научный центр противоинокционных препаратов»,
г. Алматы, Казахстан*

ПОТЕНЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ЙОДА НА КОММЕРЧЕСКИЕ АНТИВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Инфекционные болезни сопровождают человека с момента его становления как вида. По мере возникновения общества и развития социального образа жизни человека многие инфекции получили массовое распространение [1]. В настоящее время ученым известны тысячи опасных инфекционных заболеваний, способных поражать сельскохозяйственные растения, домашних животных и человека. Кроме того, постоянно возникают новые, неизвестные и ранее не встречающиеся инфекции. Проблема усложняется еще тем фактом, что многие вирусные агенты чрезвычайно быстро изменяются, что ведет к возникновению невосприимчивых или лекарственно устойчивых вариантов возбудителей. Высокая патогенность многих вирусов требует эффективных средств лечения [2].

Среди вирусных патогенов одним из наиболее распространенных является вирус гриппа. По данным официальной статистики ВОЗ, гриппом и другими ОРЗ ежегодно болеют около 40 млн. человек. С ОРЗ связаны большие экономические, социальные и медицинские проблемы. Даже в развитых странах ежегодно только от гриппа и его осложнений умирают 30 – 40 тыс. человек [1].

Антивирусные препараты, действие которых направлено против вируса гриппа, призваны сыграть важную роль в регуляции тяжести течения заболевания во время обычных сезонных вспышек, а также в стратегическом планировании будущих пандемий. Постоянно ведутся разработки препаратов, используемых как для лечения, так и профилактики гриппозной инфекции. На сегодняшний день в арсенале врачей имеется целый ряд таких препаратов. Однако большинство из них обладают высокой токсичностью, вызывая побочные действия на функционирование органов и систем организма. В тоже время широкое и отчасти беспорядочное применение противоинокционных терапевтических препаратов способствует возникновению резистентных к терапии штаммов возбудителей инфекционных заболеваний, что вызывает необходимость в совершенствовании существующих и разработке новых противовирусных соединений в качестве аль-

тернативного средства мониторинга за распространением вируса гриппа [3–5].

В свете сказанного для увеличения эффективности антивирусных препаратов проводятся работы связанные с использованием потенциаторов, позволяющих усилить специфическое действие лекарственных средств и/или снизить их терапевтическую дозу, в результате чего, эффективность лечения возрастала бы во много раз.

Одним из таких препаратов может стать новый ионный наноструктурированный комплекс (ИНСК), представляющий собой комплексное соединение йода с полидентантными лигандами, разработанный учеными АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» [6].

Цель работы: Оценка потенцирующего действия ИНСК на коммерческие антивирусные препараты в отношении вируса гриппа штамм A/FPV/Waybridge/78/H7N7 в опытах *in vitro*.

Методы исследования: опыты проводились на модели монослойной перевиваемой культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А, штамм A/FPV/Waybridge/78/H7N7.

Потенцирующее действие ИНСК на коммерческие антивирусные препараты определяли по трем схемам (терапевтической, профилактической и вирусингибирующей). В исследованиях использовали коммерческие препараты Ремантадин (производство АО «ОЛАЙНФАРМ», Латвия), Тамифлю (производство Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария), Рибазол (производство ГетзФарма (ПБТ) Лимитед, Пакистан), Амиксин (производство АОА «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия) и ИНСК, в концентрациях, не проявляющих значительного антивирусного эффекта в отношении вируса гриппа. Концентрации препаратов были подобраны опытным путем и составляли: для Ремантадина от 0,0028 мг/мл до 0,0007 мг/мл; для Тамифлю от 0,007 мг/мл до 0,0005 мг/мл; для Рибазола от 0,035 мг/мл до 0,0022 мг/мл; для Амиксина от 0,0014 мг/мл до 0,0007 мг/мл; для ИНСК концентрации составили 1,16 мг/мл и 0,58 мг/мл. Растворы препаратов готовили на питательной среде DMEM. Для определения потенцирующих свойств готовили смеси ИНСК и коммерческого препарата в исследуемых концентрациях, в соотношении 1:1. Доза вируса для заражения составляла 10 ЭИД₅₀. Планшеты с культурой клеток инкубировали 72 часа при 37,0 °C, с 5 % CO₂.

Антивирусную активность выявляли в результате снижения титра инфекционности остаточного вируса в реакции гемагглютинации. Критерием эффективности наличия потенцирующих свойств ИНСК считали различия в снижении инфекционной активности вируса под действием комплекса препаратов с ИНСК и под монодействием самих препаратов по отношению к контролю.

Результаты. В ходе экспериментов по оценке терапевтической активности было выявлено выраженное потенцирующее действие ИНСК на исследуемые коммерческие противовирусные препараты в отношении вируса гриппа штамма A/Waybrige/78/H7N7. Показано полное подавление репродукции вируса в результате совместного действия ИНСК и препаратов, что соответствовало снижению титра вируса на 4–6 $\log_2$ по сравнению с моно-воздействием противовирусных средств на вирус гриппа А.

В экспериментах по изучению исследуемой смеси в качестве профилактического средства было показано, что совместное использование ИНСК в концентрации 1,16 мг/мл с коммерческими препаратами приводило к ингибированию репродукции вируса в 8–16 раз в сравнении с образцами без использования ИНСК. Что свидетельствует о высокой потенцирующей активности ИНСК в данной концентрации.

При определении вирусингибирующей активности в культуре клеток MDCK, совместное применение ИНСК с противовирусными препаратами, усиливало противовирусный эффект коммерческих препаратов. Так применение препарата Ремантадин без использования ИНСК в исследуемых концентрациях подавляло активность вируса на 4 $\log$; препараты Тамифлю и Рибавол снижали титр инфекционности в 2 и 4 раза соответственно. При использовании препарата Амиксин вирусингибирующей активности не наблюдалось. Применение исследуемых концентраций ИНСК увеличивали вирусингибирующую активность всех, без исключения, изученных противовирусных препаратов, подавляя вирусную активность на 100 % по сравнению с контролем.

Выводы. Резюмируя полученные результаты, следует отметить высокие потенцирующие свойства ИНСК на коммерческие противовирусные препараты при экспериментальной гриппозной инфекции штаммом A/Waybrige/78/H7N7 в опытах *in vitro*. Показано усиление действия существующих противогриппозных препаратов в концентрациях, которые не проявляли выраженного противовирусного действия. Это позволит существенно снизить дозу принимаемых препаратов, тем самым снизить их токсический эффект.

Список литературы

1. Шувалова Е.П. Инфекционные болезни. М.: Медицина, 2005. 696 с.
2. Система эпизоотологического мониторинга особо опасных, экзотических, малоизученных, в том числе зооантропонозных болезней животных. М.: ВНИИВВиМ, 2001. 56 с.
3. Gani R, Hughes H., Fleming D., Griffin T., Medlock J., Leach S. Potential Impact of Antiviral Drug Use during Influenza Pandemic // Emerg. Infect. Dis. 2005. Vol. 11(9). P. 1355–1362.

4. Носков Ф.С. Новая стратегия разработки противовирусных препаратов широкого спектра действия. СПб., 2008. 127 с.

5. Hsieh HP, Hsu JT Strategies of development of antiviral agents directed against influenza virus replication // Curr Pharm. Des. 2007. Vol. 13. P. 3531–3542.

6. Ильин А. И., Кулманов М. Е. «Антибактериальный агент для лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы». Заявка на патент № РСТ/KZ2011/000019 от 09.12.2011 г.

**В. В. Богачев¹, П. Б. Барышев¹, А. В. Тотменин¹
Ф. О. Мирджамалова², Н. М. Гашникова¹**

*¹ Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»,*

*² ГБУЗ 2 НСО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД
и инфекционными заболеваниями»*

ВЫЯВЛЕНИЕ МУТАЦИЙ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА CRF63_02A1 ВИЧ-1, РАСПРОСТРАНЯЮЩЕГОСЯ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

Введение. С 2008 г. регистрируется распространенность новой рекомбинантной формы ВИЧ-1 – CRF63_02A1 в Новосибирской области (НСО), ряде сопредельных территорий и на Дальнем Востоке. В силу своего относительно недавнего возникновения данный генетический вариант требует всесторонней охарактеризации, в том числе и с точки зрения особенностей нуклеотидной последовательности генома.

Цель исследования. Выявление мутаций нуклеотидной последовательности генома, характерных для циркулирующих в НСО вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1.

Материалы и методы. Проанализировано 294 генетических варианта CRF63_02A1 ВИЧ-1, выделенных в 2008-2013 гг. от ВИЧ-инфицированных пациентов из НСО. Проведен анализ мутаций нуклеотидных последовательностей области гена *pol* размером 1300 п.н. Для поиска мутаций использовались сервисы в сети Интернет – база данных Стэнфордского университета (hivdb.stanford.edu) и программа [geno2pheno](http://www.geno2pheno.org) (www.geno2pheno.org).

Результаты. Новая рекомбинантная форма CRF63_02A1 циркулирует в различных слоях населения. Основными носителями данного варианта были мужчины – 54,5 %. Большая часть пациентов относилась к возрастной группе 25-39 лет – 65,5 %. Парентеральным путем были инфицирова-

ны 35,7 % пациентов, половым – 34,3 %, перинатальной трансмиссией – 13,1 %, для 16,9 % пациентов путь инфицирования не установлен.

В геноме исследованных вирусов выявлены мутации, вызывающие изменение чувствительности к антиретровирусным препаратам (АРВП) и генетический полиморфизм, характерный для CRF63_02A1 ВИЧ-1. Зарегистрированы преимущественно мутации, снижающие эффективность ингибиторов обратной транскриптазы. Мутации устойчивости к ингибиторам протеазы вызывали незначительное снижение эффективности (5–10%), либо встречались крайне редко (<1%). Среди вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1, выделенных от пациентов из НСО не принимавших АРВП, были выявлены мутации устойчивости K103N (5,3 %) и M184V (5,3%). Среди генетических вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1, выделенных от пациентов, принимавших АРВП, выявляются мутации устойчивости преимущественно к ННИОТ (K103N – 12 %, Y181C – 9,3 %).

Постоянные изменения внутри вирусной популяции на уровне нуклеотидной последовательности геномов с течением времени приводят к возникновению генетической обособленности ВИЧ, циркулирующих на определенной территории. Так для вариантов новой рекомбинантной формы ВИЧ, циркулирующей в НСО, было обнаружено 11 субтип-специфических мутаций (табл. 1). Некоторые мутации (K20I, M36I) свойственны ее прародителям. Также обнаруживаются с высокой частотой мутации, не свойственные предковым формам: N37D (91,0 %), I64M (91,0 %), C67Y (44,2 %), D121Y (83,0 %), I135V (38,7 %), S162A (90,8 %), K173R (56,7 %), R211N (52,4 %), V245Q (74,5 %).

Таблица 1

Мутации, свойственные генетическим вариантам CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующим в НСО в 2008–2013 гг.

Мутация	Частота встречаемости мутации в популяции ВИЧ в НСО (%)
Мутации в участке гена <i>pol</i> (pro), характерные для вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1	
K20I	100,0
M36I	97,2
N37D	91,0
I64M	91,0
C67Y*	44,2
Мутации в участке гена <i>pol</i> (RT), характерные для вариантов CRF63_02A1 ВИЧ-1	
D121Y*	83,0
I135V	38,7

S162A*	90,8
K173R	56,7
R211N	52,4
V245Q*	74,5

* – мутации, которые встречаются только в геноме данного варианта ВИЧ-1

Заключение и выводы. Согласно полученным данным можно судить о распространенности мутаций устойчивости к АРВП среди ВИЧ-инфицированных людей, не проходивших терапию. В НСО в последние годы рекомбинантная форма CRF63_02A1 ВИЧ-1 выявляется более, чем у 50% вновь инфицированных ВИЧ лиц, для данной территории становится крайне актуальным осуществление регулярного эпидемиологического надзора за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к АРВ препаратам. Несмотря на то, что для рекомбинантной формы CRF63_02A1 ВИЧ-1, циркулирующей на территории НСО, характерны некоторые мутации, свойственные ее прародителям – субтипу А и CRF02_AG, в нуклеотидной последовательности CRF63_02A1 с высокой частотой обнаруживаются мутации, не свойственные предковым формам ВИЧ-1. Обнаруженные характерные для CRF63_02A1 ВИЧ-1 мутации несут как фундаментальную, так и практическую значимость.

**А. В. Демина², В. А. Терновой², М. Ю. Карташов^{1,2}
В. А. Святченко², В. Б. Локтев², С. В. Нетесов¹
П. М. Чумаков³**

¹ *Новосибирский государственный университет*

² *Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

³ *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН*

НЕПАТОГЕННЫЕ ЭНТЕРОВИРУСЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ОНКОЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Актуальность: К принципиально новым методам терапии онкологических заболеваний следует отнести вирусный онколиз, в основе которого лежит избирательность цитолитического действия, которое оказывают на раковые клетки непатогенные или слабопатогенные для человека вирусы. Виротерапия может быть эффективна при лечении метастазирующих опухолей, которые являются неоперабельными и/или плохо поддаются радио-

терапии, химиотерапии. Энтеровирусы (ЭВ) человека рассматриваются в качестве одного из наиболее удобных исходных объектов для создания онколитических вирусов. В ИПВЭ им. М.П.Чумакова в 1970-х Ворошиловой М.К. с коллегами были исследованы штаммы энтеровирусов (ЭВ), выделенных от здоровых людей. Была установлена возможность вирусного лизиса опухолевых клеток под действием непатогенных ЭВ и проведены исследования возможности терапии онкологических заболеваний живыми энтеровирусными вакцинами.

Цель работы: поиск новых непатогенных энтеровирусов, обладающих онколитическими свойствами, первичный анализ нуклеотидных последовательностей их генома и исследование свойств ЭВ с целью создания онколитических препаратов.

Материалы и методы: штаммы непатогенных ЭВ из коллекции П. М. Чумакова (ИМБ РАН) и коллекции ФБУН ГНЦВБ «Вектор». Онколитическая активность штаммов ЭВ Коксаки В6, Коксаки А7 определялась *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека: А431, А549, SW480, С-33А, DU-145, RD, Mel-8 и на нормальных диплоидных культурах клеток человека: FECH-15, HEK293. Онколитическая активность штамма ECHO3 определялась *in vitro* на опухолевых культурах клеток человека: Hep G2, HeLa, А549, RD, С-33А, Huh7, ASPC1, Hep2 и на нормальных диплоидных культурах клеток человека: FECH-15, MRC-5, WS1. Для установления генотипов штаммов образцы были секвенированы с использованием праймеров для генотипирования ЭВ человека видов А, В, С, D на 5'UTR, а затем были секвенированы полногеномные последовательности ЭВ.

Результаты: Из коллекции энтеровирусных штаммов нами были отобраны штаммы, обладающие свойствами, эффективно размножаться на культурах опухолевых клеток человека, но при этом обладающие низкой скоростью роста на нормальных диплоидных культурах. Было установлено, что штамм Коксаки В6 (LEV15) может эффективно лизировать культуры опухолевых клеток человека С-33А (HPV-негативная карцинома шейки матки) и DU-145 (карцинома предстательной железы). А штамм Коксаки А7 (LEV8) лизирует опухолевые культуры С-33А (HPV-негативная карцинома шейки матки) и RD (клетки рабдомиосаркомы человека). В тоже время, штамм ECHO3 (ECHO3-Sakhalin) может эффективно лизировать ASPC1 (клетки рака поджелудочной железы). При этом, отобранные нами штаммы Коксаки В6, Коксаки А7 и ECHO3 либо не инфицировали, либо обладали низкой скоростью роста на нормальных диплоидных культурах клеток человека. Филогенетический анализ штамма Коксаки В6 (LEV15) показал, что наиболее близкий прототип был зарегистрирован в 1999 г. в Канаде (*Coxsackie B6 strain Schmitt* (AF105342)), анализ штамма Коксаки А7 (LEV8) показал, что наиболее близкий прототип был зарегистрирован в 2003 г. в США (*Human coxsackievirus A7 strain Parker*, (AY421765)), а фи-

логенетический анализ штамма ECHO3 (ECHO3-Sakhalin) показал, что наиболее близкий прототип был выделен в 2005 г. в Греции (*Human echovirus 3 strain LR31G7* (FJ766334)). В тоже время, найдены нуклеотидные и аминокислотные замены, отличающие исследованные штаммы от известных прототипных штаммов, которые могут обуславливать их онколитические свойства и аттенуацию по отношению к нормальным клеткам человека.

Выводы: Таким образом, нами были найдены и отобраны новые непатогенные штаммы ЭВ: Коксаки В6, Коксаки А7 и ECHO3. Определены их полные нуклеотидные последовательности, которые депонированы в международной базе GenBank (JQ041367 – JQ041368). Исследование цитолитических свойств энтеровирусных штаммов на панели опухолевых и нормальных клеток человека показало, что они могут эффективно лизировать некоторые виды опухолевых клеток, оставаясь непатогенными для нормальных клеток человека. Таким образом, данные штаммы ЭВ потенциально можно использовать в качестве онколитических препаратов. На штамм ЭВ Коксаки В6 получен патент РФ №2496873.

**А. С. Замедянская, К. А. Титова, Ал. А. Сергеев, А. С. Кабанов
Л. Е. Булычев, Ар. А. Сергеев, Д. О. Галахова, А. Е. Нестеров
О. В. Носарева, Л. Н. Шишкина, А. П. Агафонов, А. Н. Сергеев**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

ИНФЕКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ НА ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ МОНОЦИТОВ-МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Несмотря на отсутствие клинических признаков заболевания у мышей, респираторно зараженных вирусом натуральной оспы (ВНО), они активно поддерживают в первичных органах дыхательного тракта инфекционный процесс, вызванный этим возбудителем заболевания при интраназальном заражении. Учитывая то, что основными общепризнанными первичными клетками мишенями к этому возбудителю заболевания у человека являются клетки системы мононуклеарных фагоцитов, для выяснения роли этого вида мишеней у мышей в развитии инфекции в органах респираторного тракта было проведено сравнительное изучение чувствительности к ВНО первичных культур моноцитов-макрофагов человека и мышей, а также их способности продуцировать этот вирус.

В исследовании использовали штамм Ind-3a ВНО из коллекции ФБУН ГНЦВБ «Вектор» и аутбредных 8–10-суточных мышей популяции ICR из питомника этой же организации.

Монослойные первичные культуры моноцитов-макрофагов получали из образцов крови против натуральной оспы (НО) человека и из селезенки интактных мышей общепринятым методом градиентного центрифугирования с последующей адгезией этих клеток на дне лунок культуральных планшетов. Перед экспериментом клетки подсчитывали в камере Горяева. Количество клеток в лунке составляло в среднем $(9,0 \pm 1,5) \times 10^5$ кл./лунку.

Полученные монослойные первичные культуры моноцитов-макрофагов человека и мышей, зараженные ВНО в дозе 4,1 или 3,5 БОЕ/лунку, использовали для сравнительного изучения динамики накопления этого вируса. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Показано, что ВНО эффективно репродуцируется, как в первичной культуре клеток моноцитов-макрофагов человека, так и мыши. При этом наблюдали значимый прирост биологической концентрации вируса уже через 1 сутп.з. в первичной культуре моноцитов-макрофагов мышей, а максимальный уровень накопления ВНО достигал через 2 и 3 сутп.з. при использовании большой и малой доз заражения соответственно. В тоже время величины этого показателя через 6 сутп.з. начинали снижаться в данной клеточной культуре. Рост биологической концентрации ВНО в первичной культуре моноцитов-макрофагов человека впервые был отмечен через 2 сутп.з., при этом наиболее высокие уровни накопления вируса в этой клеточной культуре наблюдали через 3–6 сутп.з. с максимумом через 6 сутп.з.

Используя результаты вышепредставленных исследований, в дальнейшем были проведены эксперименты по изучению чувствительности к ВНО первичных культур клеток моноцитов-макрофагов человека и мыши, а также уровня вирусной продукции этими клетками, рассчитанные с учетом фиксации данных о наличии в них вируса через 6 и 3 сутп.з. соответственно. Результаты этих исследований представлены в табл. 2.

Таблица 1

Динамика репродукции штамма Ind-Завируса натуральной оспы (ВНО) в первичных культурах моноцитов-макрофагов человека и мыши

Вид материала	Доза заражения (lgБОВ/лунку)	Концентрация ВНО (lgБОВ/лунку, $M \pm I_{0,5}, n=4$) в клеточных материалах через разные сутки после заражения (п.з.):					
		0	1	2	3	6	
Моноциты-макрофаги крови человека	4,1	4,1 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,0	4,4 $\pm$ 0,0 [#]	5,2 $\pm$ 0,1 ^{&}	5,0 $\pm$ 0,1 ^{&}	
	3,5	3,4 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,1 [#]	4,3 $\pm$ 0,0 [#]	5,5 $\pm$ 0,0 ^{\$}	
Моноциты-макрофаги селезёнки мышей	4,1	4,1 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,0*	5,2 $\pm$ 0,1*	4,7 $\pm$ 0,1*	4,0 $\pm$ 0,3	
	3,5	3,5 $\pm$ 0,0	3,9 $\pm$ 0,1*	4,1 $\pm$ 0,0*	4,5 $\pm$ 0,0*	3,5 $\pm$ 0,1	
Клеточный дебрис	4,1	4,1 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	
	3,5	3,5 $\pm$ 0,0	2,5 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1	<0,7	

Примечание: n – число повторов определения проб; M – среднее значение; $I_{0,5}$ – 95% доверительный интервал; [#] – величина достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с таковой через 1 сутп.з.; [&] – величина достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с таковой через 2 сутп.з.; ^{\$} – величина достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с таковой через 3 сутп.з.; * – величина достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с таковой через 0 сутп.з.; <0,7 – величина ниже порога чувствительности (0,7 lg БОВ/лунку) использованного метода титрования.

Таблица 2

Чувствительность к штамму Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО)
и его продуктивность умонослойной первичной культуры
моноцитов-макрофагов человека и мышей

Показатели биологической активности ВНО	Биологическая активность ВНО в монослойной первичной культуре моноцитов-макрофагов от макроорганизмов	
	человек	мышь
Инфекционность вируса ИД ₅₀ (lgБОВЕ, М±I ₉₅)	-0,02 ± 0,23	1,03 ± 0,33*
Урожайность вируса (lg БОВЕ/1,0 млнкл., М±I ₉₅)	2,33 ± 1,16	1,89 ± 0,17

Примечание: М – среднее значение; I₉₅ – 95% доверительный интервал; ИД₅₀ – 50% инфицирующая доза; * – величина достоверно выше таковой у человека.

Показано, что первичные культуры клеток моноцитов-макрофагов человека и мыши проявляют высокую чувствительность к ВНО и вирус-продуктивную активность. Тем не менее, первичные культуры моноцитов-макрофагов мышей были примерно в 10 раз менее чувствительными к вирусу, чем клетки человека. Учитывая то, что основным первичным клетками мишенями у человека для ВНО являются клетки системы мононуклеарных фагоцитов, с которых в основном и начинается инфекционный процесс при НО, наши данные позволяют оценить верхнюю границу чувствительности человека к этому возбудителю заболевания, которая примерно соответствует 1 БОЕс учетом его обязательного взаимодействия с этими клетками, тогда как у мыши этот показатель представлен достоверно более высоким значением: ~ 10 БОЕ. Однако, несмотря на существующее небольшое различие между человеком и мышью по чувствительности к ВНО (в 10 раз), в этом плане мышь выглядит более предпочтительно, чем существующее модельное животное для НО (макака циномолгус), так как ее чувствительность к этому вирусу, оцененная по развитию оспоподобных клинических проявлений, в 1000 – 100000 раз ниже, таковой у мыши, определенной по развитию инфекционного процесса в клетках системы мононуклеарных фагоцитов. Данное обстоятельство открывает перспективу для дальнейших исследований мыши на предмет пригодности в качестве модельного животного для НО с целью оценки профилактической (экстренно-профилактической) эффективности разрабатываемых препаратов.

**А. Б. Комиссаров, А. В. Фадеев
А. А. Кошелева, М. П. Грудинин**

*Научно-исследовательский институт гриппа
Министерства здравоохранения России*

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА А ПОДТИПА H2N2 МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Грипп и другие острые респираторные инфекции являются причиной высокой заболеваемости по всему миру, в том числе и в России. Вирус гриппа А/H2N2, вызвавший пандемию т. н. «азиатского гриппа» 1957 г., был вытеснен из человеческой популяции новым пандемическим вирусом подтипа H3N2 в 1968 г. Однако вирусы гриппа А подтипа H2N2 продолжают циркулировать среди диких и домашних птиц. Отсутствие коллективного иммунитета и продолжающаяся циркуляция вируса гриппа А/H2N2 среди животных создают опасные предпосылки для возникновения новой пандемии. Одним из основных современных методов диагностики инфекционных заболеваний является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени. В настоящее время отсутствуют коммерческие наборы для выявления вирусов гриппа А подтипа H2N2. Нами были разработаны олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления вирусов гриппа А подтипа H2N2 методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

В результате анализа более 400 последовательностей гена гемагглютинина H2, депонированных в базе данных EpiFluGISAID были обнаружены локальные участки консервативности, пригодные для использования в качестве сайтов связывания праймеров и зондов, выполнен дизайн праймеров и зондов и предложено два набора праймеры-зонд для экспериментальной проверки (H2-1 и H2-2).

Произведена экспериментальная проверка предложенных праймеров и зондов как на контрольной плазмидной ДНК, так и на штамме А/Japan/305/1957 (H2N2). Для каждого набора праймеры-зонд были определены эффективность ПЦР, аналитическая чувствительность (предел детекции для H2-2 составил $10^{1,75}$ ЭИД₅₀/мл, для H2-1 – менее $10^{0,36}$ ЭИД₅₀/мл) и аналитическая специфичность.

Разработанные праймеры и зонды для выявления вирусов гриппа А/H2N2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени могут быть востребованы в случае возвращения этих вирусов в человеческую популяцию, а также при проведении клинических испытаний вакцин против гриппа А/H2N2.

Д. В. Корнеев

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

**АТОМНО-СИЛОВАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
ОДИНОЧНЫХ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ**

В основе работы атомно-силового микроскопа (АСМ) лежит силовое взаимодействие между острым твердотельным зондом и поверхностью. Зонд закреплен на упругой консоли, обычно называемой кантилевером, сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу кантилевера. Регистрируя величину изгиба, можно контролировать силу взаимодействия зонда с поверхностью. Режим работы АСМ, в котором осуществляется измерение величины силы взаимодействия зонда и поверхности, называется атомно-силовой спектроскопией (АСС). Данный метод применяется для измерения силовых характеристик взаимодействия макромолекул, наночастиц, вирионов и клеток с различными поверхностями.

Особый интерес представляет применение техники АСС для изучения взаимодействия вирусных частиц (вирионов) и поверхности живой клетки. Изучение механизмов проникновения вируса в клетку имеет не только большое фундаментальное значение, но и важно для прикладных областей, т.к. полученные данные могут указать путь к созданию эффективных противовирусных препаратов.

Для выполнения силовых измерений необходимо закрепить вирусную частицу на острие зонда АСМ. Типичная величина радиуса стандартного коммерческого зонда составляет ≈ 10 нм. Вирусные частицы (вирионы) имеют размер от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров. В работе использовались бактериофаг ф6 (60 нм), вирус гриппа А H3N2 (90–110 нм) и вирус осповакцины ($\approx 350 \times 250 \times 150$ нм). Перед посадкой вирионов на острие АСМ-зонда формировали площадку подходящего размера методом длительного циклического сканирования поверхности сапфира с большими значениями частоты и прижимной силы. Результаты модификации геометрических характеристик зонда контролировали методом просвечивающей электронной микроскопии, используя модифицированный держатель образца.

Для селективного притяжения вирионов в область острия АСМ-зонда использовали эффект положительного диэлектрорефа. Диэлектрорефом называют движение диэлектрических частиц относительно электродов, возникающее в сильном неоднородном и переменном электрическом поле. Положительным диэлектрорефом называют движение частиц по

направлению к электродам, а отрицательным – движение от электродов. Знак диэлектрофореза определяется диэлектрическими свойствами частиц и частотой электрического поля. Для определения области частот поля, соответствующей положительному диэлектрофорезу для каждого вируса, вирионы флюорохромировали FITC по стандартному протоколу и проводили диэлектрофорез в 0,3 М растворе сахарозы на измерительных ячейках под люминисцентным микроскопом. Варьируя частоту, наблюдали за изменением распределения интенсивности свечения в окрестности острия зонда.

Использовали АСМ-зонды CSG01/Au производства NT-MDT (Россия). Данные зонды изготовлены из кремния и имеют проводящее покрытие, которое позволяет использовать их в качестве электродов.

Получены воспроизводимые результаты фиксации одиночных вирусных частиц на острие АСМ-зонда, подтвержденные методом электронной микроскопии.

Список литературы

1. D. Alsteens, E. Pesavento, G. Cheuvart, V. Dupres, H. Trabelsi, P. Soumillion, Y.F. Dufrene, Controlled manipulation of bacteriophages using single-virus force spectroscopy, *ACS Nano*, 2009, 3(10), pp. 3063-3068.
2. C.L. Cheung, J.H. Hafner, C.M. Lieber, Carbon nanotube atomic force microscopy tips: Direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging, *PNAS*, 2000, 97(8), pp. 3809–3813.
3. H.A. Pohl, *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, Cambridge, 1978.

О. Г. Курская^{1,2}, К. А. Шаршов^{1,2}, А. В. Глущенко^{1,2}
М. А. Гуляева¹, А. В. Троицкий², А. М. Шестопалов²
В. А. Шкурупий²

¹ ООО НПО «Экологическая безопасность»

² Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА

Несмотря на впечатляющие достижения современной медицины, грипп и другие ОРВИ по-прежнему сохраняют свою эпидемиологическую значимость. На долю ОРВИ в нашей стране приходится около 93 % всей инфекционной патологии. Общий экономический ущерб от ОРВИ в России

составляет около 50 млрд рублей в год, до 90 % всех выплат по временной нетрудоспособности приходится на долю данной патологии. Как правило, грипп в структуре респираторной вирусной заболеваемости составляет около 20 %. В отличие от других ОРВИ, грипп имеет более тяжелое течение с развитием осложнений, а в наиболее тяжелых случаях может приводить к летальным исходам, число которых ежегодно достигает 250 000–500 000 человек в мире. Высокая скорость изменчивости генома, характерная для вируса гриппа, снижает эффективность вакцинации. Кроме того, специфические изменения генома вируса гриппа могут приводить к устойчивости к существующим противовирусным химиопрепаратам. В этой связи на первый план выходят методы фармакопрофилактики и фармакотерапии данного заболевания. В связи с этим актуальным является поиск новых эффективных лечебно-профилактических противовирусных препаратов.

Целью данной работы явилась оценка лечебной и профилактической эффективности окисленных декстранов с молекулярной массой 40 и 70 кДа при интраназальном введении на модели гриппа у мышей.

Для проведения эксперимента по изучению профилактической эффективности препаратов использовали беспородных белых мышей 6–8-недельного возраста, весом 18–20. Экспериментальным группам мышей (по 10 животных в группе) однократно интраназально вводили растворы окисленных декстранов в соответствии с таблицей 1 в дозе 2,5 мг/животное.

Таблица 1

Группы животных, вводимые растворы

Название группы животных	Вводимое вещество	Сроки введения
ОД40-1	Водный раствор окисленного декстрана с молекулярной массой 40 кДа	За 24 ч до инфицирования
ОД40-2	Водный раствор окисленного декстрана с молекулярной массой 40 кДа	За 6 ч до инфицирования
ОД40-3	Водный раствор окисленного декстрана с молекулярной массой 40 кДа	Через 24 ч после инфицирования
ОД70-1	Водный раствор окисленного декстрана с молекулярной массой 70 кДа	За 24 ч до инфицирования

ОД70-2	Водный раствор окисленного декстрана с молекулярной массой 70 кДа	За 6 ч до инфицирования
ОД70-3	Водный раствор окисленного декстрана с молекулярной массой 70 кДа	Через 24 ч после инфицирования
Контроль вируса	—	—

Инфицирование животных экспериментальных и контрольной групп осуществляли путем интраназального введения 50 мкл вирусосодержащей жидкости в дозе 10 MLD₅₀/животное. Для инфицирования использовали штамм вируса гриппа A/Tomsk/273-outbred/2010-MA(H1N1)pdm09, полученный из Музея вирусов гриппа и ОРЗ Лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Учитывали количество погибших животных в каждой группе до 14 суток после заражения, после чего рассчитывали процент летальности и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в каждой группе.

Было показано, что интраназальное введение окисленных декстранов через 24 ч после инфицирования не оказывало положительного эффекта на течение гриппозной инфекции: в данных группах животных не наблюдалось значимого уменьшения процента летальности и увеличения СПЖ по сравнению с контрольной группой. В то же время профилактическое введение окисленных декстранов молекулярной массой 40 кДа и 70 кДа за 24 ч до инфицирования вызывало снижение летальности на 50% и 60% и увеличение СПЖ на 2,0 и 4,1 суток по сравнению с контрольной группой соответственно.

В ходе последующего эксперимента оценивалась профилактическая эффективность окисленных декстранов молекулярной массой 40 и 70 кДа в сравнении с коммерческим препаратом, применяемым для профилактики гриппа и ОРВИ, при интраназальном введении на модели гриппа у мышей. Для этого однократно за 24 ч до инфицирования животных экспериментальных групп и группе сравнения (по 50 животных в группе) интраназально вводились растворы исследуемых препаратов. Инфицирование животных экспериментальных и контрольной групп, а также группы сравнения проводили как в предыдущем эксперименте. Учитывали количество погибших животных в каждой группе до 14 суток после заражения, после чего рассчитывали процент летальности и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в каждой группе.

В результате эксперимента было показано, что профилактическое введение окисленных декстранов вызывало значимое уменьшение процента летальности и увеличение СПЖ по сравнению с контрольной группой.

В то же время не наблюдалось значимых отличий данных показателей между экспериментальными группами группой сравнения. При этом наиболее выраженный положительный эффект на течение гриппозной инфекции оказывало профилактическое введение окисленного декстрана с молекулярной массой 70 кДа, который проявлялся в снижении летальности на 22% и увеличении средней продолжительности жизни на 2,6 суток в группе животных, получавших окисленный декстран с молекулярной массой 70 кДа, по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, показана профилактическая эффективность окисленных декстранов молекулярной массой 40 кДа и 70 кДа при интраназальном введении при экспериментальной гриппозной инфекции у мышей, что делает перспективным их дальнейшее исследование в качестве новых препаратов для профилактики гриппа.

**А. А. Сергеев, К. А. Титова, А. С. Кабанов, Л. Е. Булычев
А. А. Сергеев, Д. О. Галахова, А. С. Замедянская, Л. Н. Шишкина
О. С. Таранов, В. В. Омигов, А. П. Агафонов, А. Н. Сергеев**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

СУРОК КАК МОДЕЛЬНОЕ ЖИВОТНОЕ ДЛЯ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования сурков в качестве модельных животных для оспы обезьян (ОО) применительно к оценке лечебно-профилактической эффективности противооспенных препаратов.

Были проведены исследования по изучению чувствительности 1–2-летних сурков породы Байбак (*Marmota bobak*) обоего пола (массой 3–4 кг), п/к зараженных различными дозами (2,6; 4,1; 5,6; 7,1 lg БОЕ; по 4 сурка на каждую дозу) штамма V79-1-005 ВОО, относящийся к кладе центрально-африканских штаммов ВОО (Congo Basin MPXV). При этом все испытанные нами дозы патогена (не зависимо от их величины) приводили к появлению у них выраженных клинических симптомов (гипертермия тела, одно- или двусторонний подчелюстной лимфаденит, оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых оболочках, серозно-гнойные ринит, конъюнктивит и блефарит, нарушение координации, тремор конечностей, повышенная агрессивность, взерошенность

шерсти) через 7–9 сут п.з. Причем летальный исход у этих животных был отмечен во всех случаях через 12 – 18 сут п.з.

При изучении чувствительности сурков к ВОО при и/н заражении (по 4 сурка на каждую дозу: – 1,8; 0,2; 2,2; 4,2; 5,0 lg БОЕ; 2 сурка на дозу 6,6 lg БОЕ и 1 сурок на дозу 7,8 lg БОЕ) была определена ИД₅₀ по фиксации наличия внешних клинических признаков заболевания, которая составила 2,2±1,2 lg БОЕ. При этом у животных регистрировали тот же ряд описанных нами выше клинических проявлений, который наблюдали через 7–9 сут п.з., с той лишь разницей, что плотность сыпи на коже и слизистых была несколько ниже, а через 13–22 сут п.з. лишь 5 из 12 заболевших сурков погибло. В этом эксперименте у сурков не удалось определить ЛД₅₀ ВОО, из-за того, что процент летальности у них слабо зависел от величины дозы заражения.

Была изучена динамика накопления ВОО в органах, тканях и сыворотке крови сурков через 2, 3, 5, 7, 9 и 12 сут после и/н заражения дозой вируса 3,7 lg БОЕ (30 ИД₅₀ для этого вида животных), табл. 1.

Видно, что только через 5 сут п.з. вирус впервые был зарегистрирован сразу в двух первичных органах-мишенях (трахея и легкие), а также в бифуркационных лимфоузлах. В этих органах вирус выявлялся в нашем эксперименте длительное время: с 5-х по 12-е сут п.з. В селезенке патоген был обнаружен только через 7 сут п.з. и то в низкой концентрации (1,3 lg БОЕ/мл), а в последующие сроки уже не выявлялся в этом органе. Через 9 сут п.з. ВОО был зарегистрирован не только в легких и трахее, но и носовой перегородке со слизистой, головном мозге, двенадцатиперстной кишке, надпочечниках и коже. Органами и тканями максимального накопления ВОО являлись легкие, трахея, слизистая носа и кожа.

Таблица 1

Динамика накопления штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) в биоматериалах* от сурков, интраназально зараженных дозой 3,7 lg БОЕ (30 ИД₅₀)

Вид биопроб от сурков	Концентрация ВОО (lg БОЕ/мл, М±I ₉₅) в биопробах через различное время (сут) после заражения:					
	2	3	5	7	9	12
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Сыворотка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Носовая перегородка со слизи-	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	6,7±0,1	2,6±0,3

стой						
Головной мозг	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	1,6±0,6	<0,4
Трахея	<0,4	<0,4	6,5±0,3	1,7±0,1	2,9±0,1	4,5±0,1
Бифуркационные лимфоузлы	<0,4	<0,4	2,0±0,1	3,1±0,3	3,9±0,3	2,5±0,1
Легкие	<0,4	<0,4	6,5±0,3	5,9±0,3	3,2±0,3	6,5±0,1
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	1,3±0,1	<0,4	<0,4
Поджелудочная железа	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Мезентериальные лимфоузлы	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	3,8±0,3	<0,4
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4
Надпочечники	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	1,6±0,3	1,4±0,6
Кожа	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	3,0±0,1	6,6±0,3

Примечание: * – органы и ткани в составе 10%-х (по объему) гомогенатов, а также сыворотка крови; М – средняя величина концентрации вируса, рассчитанная для каждого биоматериала по данным 4-кратного повторения титровки; I_{95} – 95% доверительный интервал для М с вероятностью 95%; <0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования.

Было проведено изучение показателей накопления ВОО в органах и тканях некоторых сурков, павших в эксперименте, связанном с п/к их заражением дозами вируса 7,1 lg БОЕ (четыре животных) и 5,6 lg БОЕ (одно животное). Причем этого патоген был обнаружен в концентрации $\geq 5,7$ lg БОЕ/мл в носовой перегородке со слизистой, трахее, легких, почках, паховых и подмышечных лимфоузлах, яичках или яичниках и в кусочках кожи с оспинами; в концентрациях от 4,0 до 5,7 lg БОЕ/мл в головном мозге, поджелудочной железе, поднижнечелюстных и брыжеечных лимфоузлах; в концентрациях <4,0 lg БОЕ/мл в сердце, печени и селезенке.

У и/н инфицированных ВОО сурков дозой 3,7 lg БОЕ (30 ИД₅₀), как и подкожно зараженных, а также у некоторых других модельных животных для ОО, часто наблюдались в общем виде сходные гистологические изменения в основных органах и тканях (воспалительные и некротические очаги в легких, трахее, слизистой носовой полости, коже, селезенке, лимфоузлах, тимусе и др.), которые (независимо от дозы заражения) коррелировали со степенью тяжести у них клинических проявлений. По данным электронной микроскопии, отмечен факт присутствия и размножения ВОО в традиционных первичных клетках мишенях для этого патогена (макрофаги и эпителиоциты респираторного тракта), а также в некоторых других клетках сурков (эндотелиоцитах, ретикулярных клетках, клетках соединительной ткани).

Провели оценку эффективности профилактического действия препаратов на сурках по фиксации наличия клинических признаков заболевания (в том числе гибели животных), используя для и/н инфицирования этих животных дозу ВОО: 3,6 lg БОЕ (25 ИД₅₀), табл. 2.

Видно, что все сурки в контрольной группе заболели, при этом у данных животных отмечали появление соответствующей клинической симптоматики через 9 – 12 сут п.з. В то же время у сурков опытных групп, обработанных препаратами НИОХ-14 и ST-246, не было зарегистрировано каких-либо признаков заболевания в течение всего срока наблюдения после и/н заражения ВОО. Это убедительно свидетельствует о наличии значимого лечебно-профилактического эффекта у испытанных нами препаратов. Через 28 сут п.з. у всех животных, как опытных групп, так и выживших животных контрольной группы были обнаружены достаточно высокие титры антител к ВОО в реакции нейтрализации. Результаты этих исследований коррелировали с таковыми, полученными нами и другими учеными на культурах клеток и существующих модельных животных для ортопоксвирусных инфекций.

Таблица 2

Профилактическая активность препаратов в отношении штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО) после заражения (п.з.) сурков интраназальным способом дозой 3,6 lg БОЕ (25 лИД₅₀)

Наименование показателя	Значения показателей для сурков, обработанных препаратами перорально ежедневно однократно за 1 сут до и в течение 6 сут п.з.:		
	НИОХ-14	ST-246	контроль
Суточная доза вводимых препаратов (мг/кг массы сурков)	40	40	*

Количество животных, взятых в эксперимент	4	4	4
Количество и доля (%) заболевших	0 (0) [#]	0 (0) [#]	4 (100)
% защиты от инфицирования (заболе-	100	100	—
Количество о по-	0	0	2
Титры антител к ВОО [€] у сурков	От 1:25 до 1:625	От 1:125 до 1:625	1:625 и 1:3125

*Примечание:** – суркам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80, который использовали для растворения препаратов НИОХ и СТ-246; [#] – достоверное отличие от контроля по критерию χ^2 и точному тесту Фишера ($p \leq 0,05$); [£] – величина разницы между % незаболевших животных в опыте и контроле; «—» – величина не определяется; [€] – величины определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero в сыворотке крови, взятой через 28 сут п.з. у всех сурков опытных групп и двух выживших из контрольной группы.

Таким образом, при и/н заражении ВОО сурков породы Байбак была отмечена выраженная оспоподобная клиническая симптоматика заболевания через 7 – 9 сут п.з. ИД₅₀ ВОО для этих животных, определенная по регистрации наличия клинических признаков заболевания, составила 2,2 lg БОЕ. При этом гибель части заболевших сурков (около 40%) наступала через 13 – 22 сут п.з. и процент летальности слабо зависел от заражающей дозы ВОО. У и/н зараженных вирусом (доза 25 ИД₅₀) животных первичными органами-мишенями были легкие с трахеей. Распространение патогена в их организме к вторичным органам мишеням осуществлялось в основном лимфогенным путем (с размножением в бифуркационных лимфоузлах). Органами максимального накопления ВОО у сурков были легкие с трахеей, слизистая носа и кожа. У этих и подкожно зараженных сурков зарегистрированы факты присутствия и размножения патогена в традиционных первичных клетках мишенях для ВОО (макрофагах и эпителиоцитах органов респираторного тракта), а также в некоторых других клетках организма (эндотелиоцитах, ретикулярных клетках, клетках соединительной ткани). Использование нами этих животных при оценке противовирусной эффективности некоторых препаратов продемонстрировало адекватность полученных результатов таковым, описанным в научной литературе, что открывает перспективу применения сурков в качестве модельных животных при ОО для разработки лечебно-профилактических противооспенных препаратов.

**К. А. Титова, Ал. А. Сергеев, А. С. Кабанов, Л. Е. Булычев
А. А. Сергеев, Д. О. Горбатовская, А. С. Замедянская
Л. Н. Шишкина, О. С. Таранов, В. В. Омигов
А. П. Агафонов, А. Н. Сергеев**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

МЫШЬ КАК МОДЕЛЬНОЕ ЖИВОТНОЕ ДЛЯ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ ПРИ ОЦЕНКЕ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ

Целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования аутбредной популяции мышей ICR в качестве модельных животных для натуральной оспы применительно к оценке профилактической эффективности противооспенных препаратов.

Интраназальное (и/н) введение аутбредным 8–10-суточным белым мышам ICR (массой 8–10 г) вируса натуральной оспы (ВНО) даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 lg БОЕ/гол., не вызвало у них появления каких-либо внешних клинических признаков заболевания. В экспериментах, касающихся определения показателя чувствительности мышей к ВНО по наличию инфекционного процесса, провели изучение динамики накопления вируса в легких животных, и/н зараженных вирусом в дозе 4,2 lg БОЕ/гол. При этом получены следующие результаты: через 5–10 мин после заражения (п.з.) – 3,2 lg БОЕ/легкие; через 1 сут п.з. – 3,2 lg БОЕ/легкие; через 2 сут п.з. – 4,8 lg БОЕ/легкие; через 3 сут п.з. – 4,8 lg БОЕ/легкие; через 4 сут п.з. – 4,5 lg БОЕ/легкие; через 5 сут п.з. – 3,5 lg БОЕ/легкие; через 7 сут п.з. – 1,3 lg БОЕ/легкие. Отмечено накопление патогена в легких мышей через 2 – 5 сут п.з. с максимальным значением этого показателя через 2 и 3 сут п.з. При использованном нами методе инфицирования мышей 10 % вводимого и/н вирусного материала попадает в легкие этих животных, так как доза заражения в этом эксперименте была 4,2 lg БОЕ/гол., а количество выявленного вируса в этом органе через 5–10 мин п.з. составило 3,2 lg БОЕ/легкие.

Используя результаты предыдущих исследований, был проведен эксперимент на и/н инфицированных мышах разными дозами ВНО (1,2; 2,2; 3,2; 4,2 и 5,2 lg БОЕ/гол, по 6 животных на дозу) по оценке ИД₅₀, рассчитанной с учетом данных о наличии вируса в легких каждого животного через 3 сут п.з. При этом было определено, что значение этого показателя равно 2,7±0,4 lg БОЕ/гол. Однако с учетом того, что в легких апплицируется только 10 % вирусосодержащего материала, введенного и/н способом, ИД₅₀ ВНО для мышей в нашем случае должна быть существенно ниже (на

1,0 lg) и составить $1,7 \pm 0,4$ lg БОЕ/легкие. Это свидетельствует об относительно высокой чувствительности данного вида животных к ВНО (только с учетом развития инфекционного процесса), приближающейся к таковой у человека (по клиническим признакам заболевания): до 1,0 lg жизнеспособных вирусных частиц (БОЕ).

Проведено изучение диссеминации ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей после и/н инфицирования 30 ИД₅₀ (табл. 1). Показано, что размножение вируса происходит в основном в органах респираторного тракта мышей (в легких и слизистой носа) через 2 – 6 сут п.з.

При проведении гистологических и электронно-микроскопических исследований и/н инфицированных ВНО мышей в дозе 4,2 lg БОЕ/гол. (30 ИД₅₀/гол.) было отмечено, что основные патоморфологические изменения у этих животных начинали появляться через 5 сут п.з. и были ограничены респираторным трактом (воспалительные и деструктивные очаги в легких, трахее и слизистой носа). При этом у мышей, как и у некоторых других животных, моделирующих ортопоксвирусные инфекции у человека, часто наблюдались в общем виде сходные гистологические изменения в органах дыхательной системы. Отмечен факт присутствия и размножения ВНО в традиционных первичных клетках мишенях для этого патогена: в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах.

Кроме того, по показателям изменения продукции вируса в легких у мышей через 3 сут после и/н заражения ВНО в дозе 30 ИД₅₀/гол., была проведена оценка эффективности действия противооспенных препаратов ST-246 и НИОХ-14 при их пероральном введении 1 раз в день в дозе 60 мкг/г массы мыши за 1 сут до заражения, в день заражения и далее в течение 2 сут п.з. (табл. 2).

Отмечено, что количество инфицированных мышей, обработанных препаратами ST-246 и НИОХ-14 и зараженных ВНО, через 3 сут п.з. достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0,05$). Кроме того, используемые препараты по сравнению с контролем вызывали эффект значимого снижения средних концентраций вируса в легких мышей через 3 сут п.з. Полученные нами результаты доказывают, что ST-246 и НИОХ-14 подавляют продукцию ВНО в легких у инфицированных мышей, что совпадает с данными об эффективности этих препаратов в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВНО, полученными нами и другими учеными на культурах клеток и других видах животных.

Таблица 1

Динамика накопления штамма Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО) в органах, тканях и сыворотке крови аутобредных мышей ICR, интраназально зараженных дозой 4,2 lg БОЕ/гол. (30 ИД₅₀/гол.)

Вид биоматериала* мышей	Концентрация ВНО (lg БОЕ/мл, М±I ₉₅) в биоматериалах мышей (n=4) через раз- личное время (сут) после заражения:									
	1	2	3	4	5	6	7	10		
Клетки крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Сыворотка крови	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Головной мозг	<0,4	<0,4	1,3±0,6	<0,4	2,2±0,0	<0,4	<0,4	<0,4		
Носовая перегородка со слизистой	<0,4	4,8±0,0	3,9±0,1	3,9±0,0	3,0±0,1	2,9±0,0	4,2±0,1	<0,4		
Трахея	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Легкие	2,9±0,2	4,9±0,0	3,9±0,0	3,2±0,0	3,8±0,1	3,9±0,2	2,0±0,1	<0,4		
Пищевод	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Печень	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Селезенка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Почки	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		
Двенадцатиперстная кишка	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4	<0,4		

Примечание: * – 4 %-е гомогенаты органов и тканей, а также сыворотка крови; n – число повторов определения объединенных проб от 4 мышей; М – среднее; I₉₅ – 95% доверительный интервал, <0,4 – порог чувствительности использованного метода титрования (0,4 lg БОЕ/мл).

Таблица 2

Противовирусная активность препаратов в отношении штамма Ind-3a вируса натуральной оспы (ВНО) через 3 сут после заражения (п.з.) интраназальным способом аутбредных мышей ICR дозой 4,2 lg БОЕ/гол. (30 ИД₅₀/гол.)

Наименование показателей	Показатели инфекционности ВНО у мышей при введении препаратов в суточной дозе 60 мкг/г и в контроле:		
	НИОХ-14	ST-246	контроль
Количество ВНО в легких (в lg БОЕ/легкие) у каждой мыши через 3 сут после и/н инфицирования	2,4	2,5	4,5
	2,5	2,3	4,5
	2,1	2,3	4,4
	<1,1	<1,1	3,5
	<1,1	<1,1	2,8
	<1,1	<1,1	2,7
	<1,1	<1,1	2,7
Среднее количество вируса (lg) в легких мышей через 3 сут п.з.	2,3±0,5 ^ε (n=3)	2,4±0,3 ^ε (n=3)	3,6±0,8 (n=7)
Индекс подавления продукции (lg) [@] вируса в легких инфицированных мышей	1,1	1,1	-
Количество и доля (%) инфицированных мышей через 3 сут п.з.	3 [#] (43)	3 [#] (43)	7 (100)
Коэффициент (%) защиты от инфицирования [£]	57	57	-

Примечание: n – число животных; М – среднее; I₉₅ – 95% доверительный интервал; * – мышам контрольной группы вводили раствор метилцеллюлозы с твином–80, который использовали для растворения препаратов НИОХ-14 и ST-246; <1,1 – величина ниже порога чувствительности (1,1 lg БОЕ/легкие) использованного метода титрования; ^ε – отличие от контроля по двустороннему t-критерию Стьюдента при p=0,044; [@] – величина разницы между lg количества вируса в легких контрольной группы животных и опытной; [#] – отличие от контроля по критерию χ^2 при p=0,018 (с поправкой Йетса p=0,075); [£] – величина разницы между % неинфицированных животных в опыте и контроле; «-» – величина не определяется.

Таким образом, при и/н заражении ВНО мышей ICR даже в максимальной возможной дозе, равной $5,2 \lg$ БОЕ/гол., не было обнаружено клинических признаков заболевания. ИД₅₀ ВНО для животных, оцениваемая по регистрации наличия вируса в их легких через 3 сут п.з. с учетом 10 %-й аппликации в легких вводимого и/н вируса, была равна $1,7 \lg$ БОЕ/легкие и близка к таковой у человека, оцениваемой по клиническим проявлениям заболевания. У и/н зараженных мышей 30 ИД₅₀/гол. ВНО было обнаружено его размножение в легких и слизистой носовой полости с максимальными значениями концентраций от 3,9 до $4,9 \lg$ БОЕ/мл.

При этом у мышей, как и у человека, были зарегистрированы сходные патоморфологические изменения в органах респираторного тракта и первичные клетки мишени для ВНО (клетки системы моноклеарных фагоцитов и эпителиоциты). Использование аутбредных мышей ICR при оценке противовирусной эффективности препаратов НИОХ-14 и ST-246 продемонстрировало адекватность полученных результатов таковым, описанным в научной литературе, что открывает перспективу их применения в качестве модельных животных для натуральной оспы с целью изучения лечебно-профилактической активности препаратов.

К. С. Юрченко^{1,2}, А. В. Глушенко¹

¹ *Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН*
² *ООО «Витагор»*

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, С ЦЕЛЬЮ ОТБОРА ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *

К настоящему времени по результатам оценки эффективности методов онкотерапии пристальное внимание многих групп ученых по всему миру направлено на разработку противоопухолевых препаратов, адресно воздействующих на трансформированные клетки. Большие надежды возлагаются на разработку подходов таргетной терапии злокачественных новообразований, использующих онколитические вирусы [1]. Одним из

* Исследование было выполнено при финансовой поддержке научного проекта USDA 58-0210-2-040F и РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01196 А, под руководством проф., д-ра биол. наук А. М. Шестопалова и канд. биол. наук Н. В. Губановой.

перспективных кандидатов для виротерапии опухолей является вирус болезни Ньюкасла (ВБН) (семейство *Paramyxoviridae*, род *Avulavirus*).

В России опыт внедрения виротерапии в качестве метода лечения пациентов остается единичным, при этом используют, как правило, зарубежные вакцинные штаммы. Вместе с тем, на территории Российской Федерации (РФ) в природных популяциях птиц циркулирует множество штаммов ВБН, которые могут представлять интерес как потенциальные противоопухолевые агенты. В связи с этим, цель данного исследования заключалась в мониторинге, выделении и изучении онколитического потенциала новых неаттенуированных штаммов ВБН, выделенных от птиц на территории РФ.

Для реализации цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Выделить, наработать и определить титр штаммов ВБН.
2. Определить цитопатический потенциал выбранных штаммов ВБН в системе *in vitro* на панели линий опухолевых клеток человека.
3. Проверить цитопатический эффект ВБН в системе *in vitro* на мышинной опухоли Кребс-2.
4. Оценить онколитический эффект ВБН на модели аллотрансплантата опухоли Кребс-2 *in vivo*.

При обследовании 4678 проб, собранных за период с 2008 по 2011 гг. на территории Западной Сибири и Дальнего Востока, в 44 образцах был обнаружен инфекционный агент, обладающий гемагглютинирующими свойствами. Последующая идентификация изолированного вируса болезни Ньюкасла осуществлялась методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Исследуемые изоляты были наработаны в аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), для каждого штамма были определены гемагглютинирующий титр, индекс интрацеребральной патогенности и цитопатическая доза (ТЦД₅₀) на культуре клеток Vero. Среди штаммов с высоким значением ТЦД₅₀ для проверки онколитических свойств были выбраны: NDV/Yakutia/mallard/852/2011, NDV/Altai/pigeon/770/2011, NDV/Adigeya/duck/AD/2008.

Наличие онколитического потенциала у диких неадаптированных штаммов ВБН оценивали по жизнеспособности опухолевых клеток человека после инфицирования разной дозой вируса. Эксперимент *in vitro* был проведен на опухолевых клеточных линиях человека различной этиологии – НСТ116 (колоректальный рак), МСF7 (аденокарцинома молочной железы), Н1299 (немелкоклеточный рак легкого), U87 (глиобластома). Результаты эксперимента *in vitro* продемонстрировали наличие выраженного онколитического потенциала у двух диких неадаптированных штаммов ВБН в отношении опухолевых клеток, не уступающего по эффективности вакцинному штамму МТН-68/Н, который применяется в клинике для онкотерапии в США. При этом контрольная нетрансформированная культура

мононуклеаров периферической крови человека (МНПК) осталась не восприимчива к действию выбранных штаммов. Иммуноцитохимическое окрашивание подтвердило наличие вируса в клетках опухолевых линий.

Эксперимент *in vivo* на модели мышей линии BALB/C с привитой опухолью Кребс-2 показал эффективный лизис опухолевых клеток вирусами болезни Ньюкасла. Мышиная опухоль Кребс-2 была привита внутримышечно, после чего проведена серия интратуморальных инъекций суспензии дикого штамма вируса NDV/Altai/pigeon/770/2011. МРТ и светооптический анализ показали почти полную регрессию опухоли по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, по результатам представленного исследования создана коллекция штаммов вируса болезни Ньюкасла, среди которых представлены штаммы, обладающие выраженными онколитическими свойствами. Было показано, что штаммы вируса Ньюкасла, выделенные от птиц, обладают онколитическим эффектом как в системе *in vitro*, так и в системе *in vivo*. Эти эффекты не уступают онколитической активности известного вакцинного штамма МТН-68/Н.

Результаты данного и последующих исследований могут иметь большое значение как для понимания фундаментальных основ онколитического действия вируса, так и для создания противоопухолевых препаратов и внедрения их в клиническую практику.

Список литературы

1. Wong H. H., Lemoine N. R., Wang Y. Oncolytic viruses for cancer therapy: overcoming the obstacles // Viruses. 2010. Vol. 2. P. 78–106.

О. Е. Брызгунова¹, А. Е. Григорьева¹, Е. С. Морозкин¹
М. М. Зарипов², Е. И. Рябчикова¹, В. Е. Войццкий²
В. В. Власов¹, П. П. Лактионов¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Новосибирский областной онкологический диспансер

olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ И СОСТАВА МИКРОВЕЗИКУЛ МОЧИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Микровезикулы внеклеточной среды представляют собой удобный источник диагностического материала, в частности, циркулирующие в крови онкологических больных апоптотические тельца, содержат опухолеспецифическую ДНК, а экзосомы – опухолеспецифичные мРНК и/или миРНК. Экзосомы (30-100 нм), простасомы (50-500 нм), эктосомы (50-1000 нм), онкосомы (50-500 нм) и другие микрочастицы (100-1000 нм) обнаруживаются не только в крови, но и в моче и могут представлять интерес для диагностики таких заболеваний, как рак простаты, почки и мочевого пузыря.

Мы исследовали морфологию и ДНК/миРНК состав микровезикул мочи здоровых доноров и больных РПЖ.

Мочу осветляли двумя последовательными центрифугированиями при 400g и 17000g, 20°C, 20 мин. Микрочастицы осаждали из полученного супернатанта высокоскоростным центрифугированием при 100000g, 18°C, 90 мин, осадок ресуспендировали и переосаждали в тех же условиях. Для получения экзосом суммарные микрочастицы фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.1 мкм и повторно осаждали. Осадки ресуспендировали и исследовали при помощи ТЭМ. Концентрацию ДНК измеряли при помощи мультиплексной TaqMan ПЦР (Δ-satellite элементы и LINE1 повторы). миРНК выделяли разработанным одностадийным протоколом с использованием микроколонок «БиоСилика», концентрацию определяли TaqMan ПЦР с использованием шпилечных праймеров с комплементарной мишенью выступающей 6 нуклеотидой последовательностью.

По данным ТЭМ образцы мочи здоровых доноров и больных РПЖ содержат многочисленные микрочастицы размером 20-300 нм. Доля экзосом размером 30-100 нм в моче составляла 50-70%, а крупных частиц – 30-50% от всех микрочастиц. После фильтрации через 0.1 мкм фильтр доля экзосом в препарате возрастает до 75-85%, а максимальный размер частиц не превышает 120 нм. Препараты микрочастиц, выделенные из мочи больных

и здоровых доноров, не отличаются по концентрации белка, которая в среднем составляет 289 мкг/мл для суммарных микрочастиц и 206 мкг/мл мочи для экзосом. Концентрация ДНК в препаратах суммарных микрочастиц и экзосом не отличается и не зависит от состояния пациента (составляя в среднем 10 пкг/мл мочи). Однако, A-satellite перепредставлены в 2-3 раза относительно LINE1. С эффективностью не менее 60% выделены миРНК из препаратов экзосом от 10 больных РПЖ и 20 здоровых доноров. Обнаружено, что некоторые миРНК, например миРНК-126, перепредставлены, в то время как другие, такие как миРНК-16, недопредставлены, как экзосомах, так и в суммарных микрочастицах мочи.

Е. В. Жорник, Л. А. Баранова, И. Д. Волотовский

Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, Минск, Беларусь

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МАРКЕРОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ДИОКСИДА ТИТАНА *

В настоящее время всё возрастающее внимание во всем мире уделяется развитию технологий направленного получения и использования материалов в диапазоне размеров до 100 нм. На смену технологическим процессам, связанным с манипуляциями микрочастицами, пришли процессы, позволяющие работать с наночастицами – материалами и веществами размерами меньше одного микрона.

Достижения стремительно развивающихся нанотехнологий нашли широкое применение в различных областях науки, производства, медицины, например, в онкологии и кардиологии, при создании биомаркеров, доставки лекарственных препаратов, в молекулярной диагностике.

В связи с опасностью проявления токсических свойств используемых наночастиц актуальным представляется изучение молекулярных механизмов их цитотоксичности и связанного с ней риска их воздействия на организменном и клеточном уровнях. Показано, что взаимодействие наночастиц с поверхностью клетки приводит к возникновению в ней окислительного стресса, высвобождению провоспалительных цитокинов, снижению клеточной жизнеспособности и ослаблению фагоцитарной функции.

Популяция лимфоцитов периферической крови человека является одним из основных компонентов иммунной системы и участвует практиче-

* Работа проводилась в рамках ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» подпрограмма «Геномика» и при поддержке гранта БРФФИ № Б13М-132.

ски во всех формах и этапах формирования иммунного ответа. Важная роль в возникновении иммунного ответа клеток принадлежит цитокинам – молекулам-посредникам межклеточных взаимодействий, регулирующим кроветворение, клеточный цикл, апоптоз. Стимуляция клеток цитокинами индуцирует, в свою очередь экспрессию ядерного фактора NF- κ B, который играет ключевую роль в реализации апоптотического сигнала. Вопрос о роли наночастиц в качестве генотоксического агента практически не изучен.

Нами было исследовано влияние наночастиц серебра и диоксида титана на экспрессию генов TNF α , IL-6 и IL-8, отвечающих за синтез растворимых внутриклеточных медиаторов (фактора некроза опухоли, интерлейкинов), участвующих в сигнальных каскадах воспалительных реакций.

В экспериментах использовали свежую донорскую кровь, полученную в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Изучение экспрессии данных генов проводили при помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием в качестве матрицы для амплификации суммарную кДНК контрольных лимфоцитов и лимфоцитов после воздействия наночастиц. В качестве гена внутреннего контроля был выбран ген 18S субъединицы рРНК, уровень экспрессии которого является практически неизменным при различных условиях проведения эксперимента.

В результате проведенных исследований было установлено увеличение экспрессии генов TNF- α , IL-6 и IL-8 в зависимости от времени инкубации с наночастицами. Полученные данные показывают, что обработка лимфоцитов наночастицами серебра и диоксида титана приводит к активации генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-8 и TNF- α . Известно, что TNF- α способен усиливать экспрессию Fas-антигена на клетках мишенях, подготавливая их тем самым к апоптозу. Можно предположить также, что увеличение экспрессии гена TNF- α приводит к активации факторов транскрипции NF-B, AP-1, которые в свою очередь регулируют активность генов медиаторов воспалительных реакций.

**Р. А. Максютов, Т. В. Трегубчак
А. З. Максютов, Е. В. Гаврилова**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

СОЗДАНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ С ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ *

Основная тенденция в терапии рака сегодня – это комплексный подход, главная цель которого повысить эффективность традиционных средств терапии с помощью новых методов лечения. Одним из таких методов является биотерапия опухолей с помощью онколитических вирусов, целесообразность которого обусловлена их способностью, помимо прямого цитодеструктивного действия, влиять на организм в целом, восстанавливая его естественные антиканцерогенные свойства путем индукции специфического и неспецифического иммунитета [1].

Среди всех изучаемых вирусов, особое внимание следует обратить на вирус осповакцины (ВОВ), обладающий тропизмом к широкому кругу клеток млекопитающих [2]. Одна из инфекционных форм вируса – EЕV имеет дополнительную липопротеиновую оболочку, которая позволяет вирусу избегать действия нейтрализующих антител, способствуя распространению к отдаленным вторичным очагам опухоли (метастазам) [3]. Размножение вируса происходит полностью в цитоплазме клетки, что исключает любые взаимодействия с геномом хозяина, а длинная история клинического применения в процессе искоренения натуральной оспы, гарантирует его безопасность при применении для человека.

Целью настоящего исследования было создание платформы, содержащей набор онколитических вирусов осповакцины, экспрессирующих иммуностимулирующие и противораковые терапевтические молекулы. Для адресного лизиса опухолевых клеток, в геноме ВОВ инактивировали гены, кодирующие тимидинкиназу (TK) и вирусный ростовой фактор (VGF), нарушение которых практически полностью снижает способность вируса реплицироваться в здоровых клетках организма [4]. На место указанных генов встроили гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP) для диагностического использования, белок TRAIL, индуцирующий апоптоз по p53 независимому пути во многих типах опухолевых клеток [5], и иммуностимулирующий белок гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF), усиливающий экспрессию антигенов

* Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения № 8152 и 8536.

II класса МНС на моноцитах человека и повышающий цитотоксичность нейтрофилов в отношении злокачественных клеток [6].

На первом этапе работы по причине высокой гетерогенности ВОВ штамм ЛИВП, необходимо было получить охарактеризованный клоновый вариант вируса. Клонирование исходного штамма ВОВ ЛИВП из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» проводили методом бляшек на монослое перевиваемой культуры клеток почки зеленой мартышки CV-1 под твердым агарозным покрытием [7]. В результате было получено 16 клоновых вариантов вируса. Анализ выбранных клонов проводили с помощью ПЦР по десяти основным генам, кодирующим факторы вирулентности: J2R, C11R, A56R, N1L, B8R, F4L, E3L, C3L, J2R, C12L. Также проводили секвенирование областей генома, содержащих и фланкирующих два целевых гена-мишени (J2R и C11R), кодирующих ТК и VGF, соответственно. В дальнейшую работу был выбран клоновый вариант ВОВ ЛИВП, положительный по основным генам, кодирующим факторы вирулентности, и нуклеотидной последовательностью районов нарушаемых генов соответствующей ВОВ штамм ЛИВП (GenBank: AY678276.1).

Для получения рекомбинантных вирусов с инактивированными генами, кодирующими ТК и VGF, и встроенными генами, кодирующими GM-CSF, TRAIL и GFP, нами был выбран метод временной доминантной селекции [8]. Для реализации этого подхода был создан набор плазмид интеграции, каждая из которых несет доминантный селективный маркер (ген *gpt E.coli* под контролем 7.5K-промотора ВОВ), расположенный вне протяженных областей гомологии с ДНК вируса; последовательности генома ВОВ, содержащие и фланкирующие нарушаемый ген, кодирующий ТК или VGF; последовательности искусственного полилинкера, содержащего синтетический ранне-поздний промотор [9], сигналы терминции транскрипции и трансляции (TTTTTNT); последовательности генов, кодирующих GM-CSF, TRAIL и GFP.

Для конструирования плазмиды интеграции рΔТК, предназначенной для инактивации в геноме ВОВ гена, кодирующего ТК, методом ПЦР получали два фрагмента вирусного генома, длиной 750 п.н. каждый, разделяющие ген, кодирующий ТК, справа и слева. В качестве матрицы использовали ДНК выбранного ранее клонового варианта ВОВ штамм ЛИВП. Полученные левофланкирующий (L) и правофланкирующий (R) ПЦР фрагменты обрабатывали рестриктазами и лигировали с плазмидным вектором pMGCgpt, содержащим доминантный селективный маркер [10]. Далее в полученную конструкцию между L и R фрагментами встраивали искусственный полилинкер с последующим подтверждением правильности нуклеотидных последовательностей секвенированием на автоматическом секвенаторе 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Получение плазмиды интеграции pΔVGF, предназначенной для инактивации в геноме BOB гена, кодирующего VGF, осуществляли аналогично вышеописанному с использованием фрагментов ДНК L и R фланков гена, кодирующего VGF.

На следующем этапе были получены методом ПЦР из длинных олигонуклеотидов искусственные гены, кодирующие GM-CSF и TRAIL, с модифицированным кодоновым составом, оптимизированным для экспрессии в клетках млекопитающих. Ген, кодирующий фенотипический маркер GFP, был получен методом ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду pIRES2-AcGFP1 (Clontech Laboratories, США). Далее для конструирования плазмид интеграции pΔTK/GMCSF(+), pΔVGF/TRAIL(+) и pΔVGF/GFP(+) полученные гены клонировали в плазмиды pΔTK и pΔVGF под контроль синтетического ранне-позднего промотора. Правильность нуклеотидных последовательностей всех плазмид интеграции были подтверждены секвенированием.

На основе выбранного клонового варианта вируса осповакцины штамм ЛИВП с помощью плазмид интеграции были получены рекомбинантные BOB с делецией генов, кодирующих TK и/или VGF, и встроенными генами, кодирующими GM-CSF, TRAIL и GFP. Этап трансфекции, осуществленный с помощью липофектамина (Invitrogen, США) согласно методике производителя, и шесть последующих пассажей на перевиваемой культуре клеток CV-1 проводили в селективной питательной среде DMEM (Биолот, Россия) с 2 % эмбриональной сывороткой коров (HyClone, США) в присутствии ксантина (250 мкг/мл), гипоксантина (15 мкг/мл) и микофеноловой кислоты (25 мкг/мл). После снятия селективного давления клонирование рекомбинантных BOB ЛИВП проводили методом бляшек на монослое клеток CV-1 или клеток карциномы гортани человека Hep-2 под твердым агарозным покрытием [7]. Выделение вирусной ДНК независимых клонов проводили с помощью QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США) с последующим ПЦР-анализом с использованием специфических праймеров для скрининга клонов по районам генома, содержащих и фланкирующих гены-мишени J2R и C11R. Правильность нуклеотидных последовательностей генов-мишеней, кодирующих TK и VGF, и встроенных генов, кодирующих GM-CSF, TRAIL и GFP, выбранных клонов всех рекомбинантных вирусов были подтверждены секвенированием. Эффективность экспрессии GM-CSF и апоптоз-индуцирующего белка TRAIL созданными рекомбинантными BOB были продемонстрированы вестерн блот анализом с помощью поликлональных антител, полученных к прокариотическим вариантам данных белков.

Таким образом, была создана платформа, состоящая из шести онкологических вирусов осповакцины, экспрессирующих фенотипический маркер, иммуностимулирующие и противораковые терапевтические молекулы. Инактивация генов, кодирующих тимидинкиназу и вирусный ростовой

фактор, обеспечит высокую тропность созданных вирусов к опухолевым клеткам. Экспрессия ГМ-КСФ позволит лучше представлять раковые антигены иммунной системе организма, а экспрессия апоптоз-индуцирующего белка позволит скорректировать мутации в геноме опухолевых клеток и активировать апоптоз. Учитывая высокую тропность, рекомбинантный вирус, экспрессирующий флуоресцентный белок, будет ориентирован на мельчайшие скопления раковых клеток, а быстрая репликация вируса позволит наработать тысячи копий флуоресцентного белка в каждой раковой клетке, что позволит детектировать состояние опухоли и наличие последующих метастаз.

Список литературы

- Prestwich R.J., et al. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008, 10, 1581-1588.
Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопокс-вирусы. Москва: KMK Scientific Press Ltd. 1998, 386.
Shen Y., Nemunaitis J. *Mol Ther.* 2005, 11, 180-195.
McCart J.A., et al. *Cancer Res.* 2001, 61, 8751-8757.
Holoch P.A., Griffith T.S. *Eur J Pharmacol.* 2009, 625, 63-72.
Gupta R., Emens L.A. *Discov Med.* 2010, 50, 52-60.
Kochneva G.V., et al. *Virus Res.* 1994, 34, 49-61.
Falkner F.G., Moss B. *J Virol.* 1990, 64, 3108-3111.
Chakrabarti S., Sisler J.R., Moss B. *Biotechniques* 1997, 6, 1094-1097.
Колосова И.В., и др. Молекулярная биология 2003, 37, 585-594.

Н. А. Никитенко¹, **T. Speiseder**², **P. Groitl**², **П. В. Спирин**¹
М. М. Прокофьева¹, **E. Lam**², **T. Dobner**², **В. С. Прасолов**¹

¹ *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН*

² *Heinrich Pette Institute – Leibniz Institute for Experimental Virology,
Germany*

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АДЕНОВИРУСОВ ГРУППЫ D КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Аденовирусы человека (HAdV) – безоболочечные вирусы, геном которых представлен линейной несегментированной двухцепочечной ДНК. В настоящее время известно 64 типа HAdV, которые подразделяют на группы А-F. Аденовирусы вызывают различные заболевания человека: поражения дыхательной и пищеварительной систем, а также глазные инфекции. Заражение аденовирусом типа 36 группы D человека (HAdV 36), как полагают, способствует развитию ожирения у детей. Наиболее тяжелые формы офтальмологической инфекции (конъюнктивит – воспаление

слизистой оболочки глаза конъюнктивы, и аденовирусный эпидемический кератоконъюнктивит – сочетанное воспаление конъюнктивы и роговицы) вызывают HAdV 8, 19, и 37, также относящиеся к группе D. Эпидемическим кератоконъюнктивитом в России ежегодно страдают более 300000 человек. Последствиями данного заболевания могут быть временная или стойкая утрата зрения. Недостаточная эффективность существующих подходов к лечению аденовирусной инфекции диктует необходимость разработки терапевтических средств с избирательным механизмом действия на возбудителей данного заболевания.

В соответствии с экспрессией на разных этапах жизненного цикла гены аденовируса подразделяют на ранние, промежуточные и поздние. Ранний ген HAdV *E2B* кодирует вирусную ДНК-полимеразу, которая играет ключевую роль в процессах репликации вирусного генома. Ген аденовируса человека *E1A* также относят к ранним. *E1A* является активатором транскрипции всех ранних генов HAdV и повышает эффективность репликации вируса. Таким образом, гены *E2B* и *E1A*, а также их продукты могут стать потенциальными мишенями для разрабатываемых терапевтических препаратов.

Целью исследования является разработка подхода для эффективного подавления экспрессии генов *E2B* и *E1A* аденовирусов группы D человека с помощью РНК-интерференции.

Для получения модельных клеток, в которых осуществляется экспрессия гена ДНК-полимеразы HAdV 36 (*E2B-D36*) нами были сконструированы лентивирусные векторы, геном которых содержал целевой ген *E2B-D36* и ген флуоресцентного белка tdTomato, разделенные последовательностью IRES, а также ген устойчивости к пуromицину. Клетки линий A549 и H1299 были трансдуцированы такими лентивирусными векторами. Через 48 ч после трансдукции клетки подвергались селекции на среде с антибиотиком пуromицином (3 мкг/мл). Селекцию продолжали еще 5 дней после гибели всех контрольных клеток, не содержащих ген устойчивости к пуromицину. Для получения сублиний модельных клеток был применен метод предельных разведений.

Для подавления экспрессии гена *E2B* HAdV 8, 19, 36 и 37 были синтезированы 3 типа малых интерферирующих РНК (siРНК-E2B-1, siРНК-E2B-2 и siРНК-E2B-3). В качестве контроля использовали siРНК Scramble, последовательность которой не имеет гомологии с известными мРНК человека, мыши и крысы.

Изменение уровня экспрессии целевого гена *E2B-D36* под действием siРНК оценивали методами проточной цитофлуориметрии (по уровню флуоресценции маркерного белка tdTomato) и ПЦР в реальном времени. Через 48 ч после трансфекции siРНК (в концентрации 200 нМ) в клетки модельных линий наблюдали снижение средней интенсивности флуоресценции (MFI) маркерного белка tdTomato на 66,3% при использовании

siРНК-E2B-1 и на 48–50 % под действием siРНК-E2B-2 и siРНК-E2B-3 по сравнению с контролем. Количество мРНК *E2B-D36* снижалось на 78,5, 61 и 50 % при использовании siРНК-E2B-1, siРНК-E2B-2 и siРНК-E2B-3, соответственно, по сравнению с контролем.

Нами были сконструированы лентивирусные векторы, кодирующие малые шпилечные РНК (shРНК), последовательности которых соответствуют последовательностям siРНК-E2B-1 (с самым высоким уровнем подавления экспрессии *E2B-D36*) и контрольной siРНК Scramble. Биологическую активность shРНК оценивали через 14 дней после трансдукции трансгенных клеток A549 и H1299 с помощью методов ПЦР в реальном времени и Вестерн-блота. Наблюдали снижение экспрессии мРНК *E2B-D36* на 86,1 %, а также уменьшение количества белка ДНК-полимеразы HAdV 36 на 65 % по сравнению с контролем.

Было исследовано действие shРНК-E2B-1 на репликацию аденовирусов. Клетки линии H1299, в которых осуществлялась экспрессия shРНК-E2B-1 или контрольной shРНК Scramble, заражали HAdV 8 и 37 (множественность инфекции 20 FFU/клетка). Через 6 дней после инфекции наблюдали подавление репликации этих вирусов под действием shРНК-E2B-1 на 92 и 90 % соответственно, по сравнению с контролем.

Известно, что экспрессия гена *E1A* приводит к развитию апоптоза. Поэтому исследование ингибирующей активности siРНК, комплементарных участкам мРНК *E1A* HAdV 8, 19, 36 и 37 (siРНК-E1A-1, siРНК-E1A-2 и siРНК-E1A-3) проводили по следующей схеме. Вначале клетки линий A549 и H1299 трансфицировали siРНК-E1A-1, siРНК-E1A-2, siРНК-E1A-3 и контрольной siРНК Scramble (в концентрации 200 нМ). Через 24 ч проводили трансдукцию этих клеток лентивирусными векторами, содержащими ген *E1A* HAdV 36 (*E1A-D36*) и ген красного флуоресцентного белка tdTomato, разделенные последовательностью IRES. Эффективность действия siРНК оценивали спустя 48ч. MFI маркерного белка tdTomato снижалась на 26,2, 61,3 и 55,7 % под действием siРНК-E1A-1, siРНК-E1A-2, siРНК-E1A-3, соответственно, по сравнению с контролем. Количество мРНК *E1A-D36* снижалось на 50,1, 87,8 и 62,5 % при использовании siРНК-E1A-1, siРНК-E1A-2, siРНК-E1A-3, соответственно, по сравнению с контролем.

Нами создана модельная система, позволяющая оценивать эффективность ингибирующих агентов в отношении ключевых факторов репликации аденовирусов – генов *E2B* и *E1A* и их продуктов. Мы показали существенное снижение уровней экспрессии целевых генов в клетках модельных линий, а также эффективное подавление репликации аденовирусов группы D в результате действия siРНК и shРНК. Полученные данные могут служить основой для разработки высокоэффективных и специфичных средств для борьбы с заболеваниями человека, которые вызывают аденовирусы.

Е. С. Одинцова¹, С. В. Баранова¹, Т. А. Пархоменко¹
В. Н. Бунева^{1,2}, Г. А. Невинский^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Новосибирский государственный университет*

НОВЫЕ МАРКЕРЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ *

Поиск новых маркеров вирусных и аутоиммунных патологий является важной проблемой современной биохимии и молекулярной медицины. В настоящее время для диагностики ВИЧ-инфекции широко используют методы иммуоферментного анализа и ПЦР для определения титра вирионов. Наиболее простым способом определения перехода заболевания в стадию, требующую применения лечения, является обнаружение ранних симптомов вторичных заболеваний. Появление симптомов оппортунистических инфекций является важным критерием для назначения антиретровирусной терапии; высокий уровень содержания вирусных частиц в крови является прогностическим признаком более быстрого развития заболевания.

В ходе настоящей работы изучена корреляция клинических особенностей и характера течения ВИЧ-инфекции с содержанием в крови пациентов антител против антигенов инфекционных агентов, ДНК, некоторых белков человека (гистонов, основного белка миелина), а также каталитически активных антител с различными активностями. Каталитическая активность антител крови ВИЧ-инфицированных коррелирует с характером течения ВИЧ-инфекции, при быстрой и медленной прогрессии заболевания отличаются профили гидролиза ДНК и казеина. На основании общепринятых критериев показано, что ДНК-гидролизующая и протеолитическая активность каталитически активных антител из крови ВИЧ-инфицированных больных являются их собственным свойством. Показано, что препараты поликлональных IgG и IgM из крови ВИЧ-инфицированных больных содержат небольшую фракцию антител, которые, в отличие от классических протеаз, с высокой эффективностью гидролизуют только интегразу ВИЧ, но не другие белки. Установлено, что суммарный пул антител крови больных ВИЧ-инфекцией содержит в различном соотношении абзимы с активными центрами, подобными тиоловым, сериновым, кислым и металлопротеазам. Показано, что при ВИЧ-инфекции образуется широкий спектр каталитически активных антител с различными ферментативными характеристиками, при этом состав спектра индивидуален для каж-

* Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-00211, 14-04-31281, а также грантом мэрии г. Новосибирска № 09-14.

дого пациента. Каталитические свойства антител и классических протеаз человека (сродство к субстратам, металл- и pH-зависимость, субстратная специфичность) существенно различаются. Показано, что у ВИЧ-инфицированных больных выявляемость протеолитической и нуклеазной активностей антител зависит от стадии и особенностей течения заболевания. Показано, что предынкубация интегразы ВИЧ с антителами против интегразы приводит к потере ферментом его каталитических функций. Показано, что каталитически активные IgG и IgM при ВИЧ-инфекции содержат большое число субфракций, характеризующихся различными величинами K_M и k_{cat} по отношению к интегразе и другим белкам.

Дальнейшие исследования будут направлены на разработку общих подходов к дифференциальной диагностике аутоиммунных заболеваний и патологий, при которых происходит развитие аутоиммунных процессов (ВИЧ/СПИД, рассеянный склероз, системная красная волчанка), выявление основных факторов стимулирующих развитие аутоиммунных процессов при этих патологиях, а также поиск новых лекарственных средств для подавления накопления абзимов, гидролизующих ДНК и ОБМ.

А. А. Пономарева¹, Е. Ю. Рыкова², Н. В. Чердынцева^{1,4,5}

Т. Э. Скворцова², Л. О. Брызгалов³, А. Ю. Добродеев¹

А. А. Завьялов¹, С. А. Тузиков¹, В. В. Власов², П. П. Лактионов²

¹ Институт онкологии СО РАМН

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

³ Институт цитологии и генетики СО РАН

⁴ Томский национальный исследовательский
государственный университет

⁵ Сибирский государственный медицинский университет

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАКА ЛЕГКОГО В ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК КРОВИ: ДИАГНОСТИКА И МОНИТОРИНГ ПОСЛЕ ТЕРАПИИ *

Актуальность. В последние годы ведется активный поиск маркеров ранней диагностики и прогнозирования клинического течения рака легкого, которые можно было бы детектировать в биологических жидкостях организма. В связи с этим большое внимание уделяется изучению ДНК, циркулирующих в плазме и сыворотке крови, при развитии злокачествен-

* Работа поддержана проектом Президиума СО РАН совместно со сторонними организациями № 65 (2012–2014), грантом фонда им. Бортника по программе «УМНИК» (2012–2013).

ных новообразований. Показано, что в норме циркулирующие ДНК (цирДНК) присутствуют в плазме крови в невысокой концентрации, которая существенно возрастает при онкологических заболеваниях (Schwarzenbach, 2013). Концентрация и состав циркулирующих ДНК определяются сложными взаимодействиями в процессе их образования, циркуляции, элиминации (Korshunova et al., 2008; Rykova et al., 2012), закономерности которых пока мало изучены. Анализ целевых генов-кандидатов и исследования на полногеномном уровне показали, что даже в крови здоровых лиц представленность разных последовательностей цирДНК отличается от ДНК генома (Beck et al., 2010). В литературе представлены сведения о том, что при раке в составе цирДНК плазмы крови накапливаются фрагменты измененных ДНК, идентичных ДНК опухоли, которые могут являться потенциальными онкомаркерами (Schwarzenbach, 2013). Данные полученные ранее показали, что цирДНК присутствуют как в плазме крови, так и во фракции, связанной с поверхностью клеток крови, причем у онкологических больных эпигенетические ДНК-онкомаркеры выявлялись в обеих фракциях цирДНК (Kolesnikova et al., 2008; Skvortsova et al., 2008, Rykova et al., 2012). Целью данной работы явилась оценка диагностической значимости изменений уровня метилирования генов опухолевой супрессии *RARB2* и *RASSF1A* в цирДНК крови больных раком легкого до и после комбинированной терапии.

Материалы и методы. В исследование включено 60 больных с морфологически верифицированным диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» (НМРЛ) в возрасте от 40 до 70 лет ($55,0 \pm 6,4$ лет), со стадией опухолевого процесса $T_{1-3}N_{0-3}M_0$, прошедшие стандартное комбинированное лечение в клиниках НИИ онкологии СО РАМН. Материалом для исследования послужила венозная кровь, которая забиралась до лечения, на 10–15-е сутки после операции и затем каждые 3 месяца в процессе динамического наблюдения пациента. В контрольную выборку включено 33 практически здоровых мужчин в возрасте от 35 до 60 лет ($47,5 \pm 5,5$). Кровь разделяли на плазму и клетки крови, фракцию цирДНК, связанных с клеточной поверхностью, получали последовательной обработкой клеток 5мМ фосфатным буфером и 0,25 % раствором трипсина. ДНК, выделенная из этих двух фракций, представляет собой фракцию, связанную с клеточной поверхностью (скп-цирДНК). ДНК выделяли с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.». Концентрацию метилированных и неметилированных аллелей генов опухолевой супрессии *RARB2* и *RASSF1A* в циркулирующих ДНК крови определяли с использованием количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР). Индекс метилирования генов вычисляли по

формуле $ИМ (\%) = 100 \times (\text{число метилированных форм гена} / (\text{число метилированных} + \text{число неметилированных форм}))$ для цирДНК плазмы и скп-цирДНК. Для статистической обработки данных использовался пакет прикладных программ «Statistica for Windows 6.0» (Mann-Whitney U-test, ANOVA), Principal Component Analysis (PCA), Random Forest package in R (Random forest classification tree model).

Результаты. Гиперметилирование генов *RASSF1A* и *RARB2* выявляли с высокой чувствительностью (45–60 и 39–50 %) в клетках опухоли при НМРЛ (Hsu et al., 2007; Zhang et al., 2011). При этом чувствительность, с которой метилированные последовательности этих генов детектировали в составе цирДНК плазмы крови больных раком, была ниже по сравнению с образцами опухолевой ткани, и варьирует в зависимости от используемого метода детекции (37–54 % – для гена *RARB2* и 12–39 % – для гена *RASSF1A*, соответственно) (Kontic et al., 2012). Для того чтобы повысить чувствительность детекции метилированных форм генов опухолевой супрессии генов *RASSF1A* и *RARB2* при раке легкого, при помощи количественной МС-ПЦР в настоящей работе определены концентрации метилированных и неметилированных форм исследуемых генов в цирДНК плазмы крови, и в цирДНК, связанных с клеточной поверхностью. На основании полученных данных был рассчитан индекс метилирования каждого гена (см. Материалы и методы). Выявлено статистически значимое повышение индекса метилирования генов *RASSF1A*, *RARB2* в цирДНК плазмы и в скп-цирДНК, у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни). Показано, что повышение значений ИМ генов *RARB2*, *RASSF1A* в крови у больных НМРЛ до лечения ассоциировано с большей распространенностью заболевания ($p = 0,04$, критерий Манна-Уитни), при этом статистически значимых изменений данного показателя в зависимости от пола, возраста пациентов, статуса курения, гистологического типа опухоли не выявлено.

Для того чтобы выявить возможную связь между комплексом показателей (ИМ генов *RARB2* и *RASSF1A* в обеих фракциях цирДНК крови) и клинико-морфологическими параметрами больных мы провели многофакторный анализ с использованием метода PCA. Показана наиболее выраженная ассоциация между повышением уровня метилирования исследуемых генов и наличием заболевания ($p < 0,001$). Менее выраженная ассоциация обнаружена между уровнем метилирования и стадией заболевания и возрастом пациентов ($p = 0,03$ и $p = 0,04$, соответственно). В то же время не показано значимой связи между повышением значений индекса метилирования и гистологическим типом опухоли.

С целью оценки диагностической значимости изучаемых показателей построена предсказательная модель с использованием метода Random Forest Classification (Random Forest package in R). В Random forest classification tree модель включены основные переменные – индекс мети-

лирования генов *RARB2*, *RASSF1A* в цирДНК плазмы крови, скп-цирДНК, в качестве дополнительных переменных «возраст» и «стадия». В этом случае точность предсказательной модели составила 89%, чувствительность – 91% и специфичность – 87%.

Для того чтобы определить влияние комбинированного лечения на концентрацию метилированных форм исследуемых генов мы оценили, как изменяется ИМ у больных раком легкого после 2-х курсов неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) и последующего хирургического вмешательства с интраоперационной лучевой терапией на фоне радиосенсибилизации. Исследование было проведено на 43 образцах крови от больных НМРЛ до начала лечения, после НАХТ (15-30 дней до хирургической операции) и 10-15 дней после операции. Показано, что после химиотерапии наблюдается тенденция к снижению значений ИМ для обоих генов в цирДНК крови по сравнению со значениями ИМ до лечения (что может быть связано с частичной редукцией опухолевой массы, которое подтверждается инструментальными методами). После радикальной резекции опухоли выявлено более выраженное снижение значений ИМ генов *RASSF1A* и *RARB2* в обеих фракциях цирДНК крови. Это говорит о том, что увеличение уровня метилированных форм генов *RARB2* и *RASSF1A* во фракциях цирДНК крови обусловлено присутствием в организме опухоли, удаление которой и приводит к снижению данного показателя до значений, соответствующих здоровым донорам ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни).

Снижение ИМ генов *RARB2* и *RASSF1A* в цирДНК крови больных раком легкого после лечения указывает на то, что концентрация метилированных маркеров в крови значительно снижается при частичной или полной резекции опухоли. С целью оценки информативности исследуемых эпигенетических маркеров для раннего выявления рецидивов исследован уровень эпигенетических маркеров у больных НМРЛ в сопоставлении с данными клинико-инструментального обследования. В настоящей работе был определен ИМ генов *RARB2* и *RASSF1A* у больных ($n=26$) на этапах мониторинга через 3, 6 и 9 месяцев после комбинированного лечения. Например, показано, что у пациентов с признаками прогрессии заболевания (выявленными клинически через 9 месяцев после лечения) наблюдается повышение концентрации метилированных форм генов *RARB2* и *RASSF1A* в 100% (5/5) случаев.

Заключение. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об информативности количественного анализа изученных в работе эпигенетических маркеров в цирДНК крови в диагностике рака легкого, оценке эффективности проводимого лечения и на этапах динамического наблюдения с целью раннего выявления рецидива. Для подтверждения клинической ценности эпигенетических маркеров (индекс метилирования генов *RARB2*, *RASSF1A*) требуется валидация полученных результатов на большей выборке. Расширение панели исследуемых метилированных маркеров

может быть перспективным для повышения клинической значимости их тестирования.

А. В. Разуваева

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

ОСОБЕННОСТИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПАРТМЕНТАХ

ДНК – главный носитель генетической информации в клетке – может повреждаться различными агентами физической и химической природы. Наличие ДНК в клетке не ограничено одним лишь ядром. В других оргanelлах – митохондриях и хлоропластах – содержится собственная ДНК.

В клетках человека митохондриальный геном, по сравнению с ядерным, более доступен для действия окислительного стресса, что объясняется, главным образом, близостью электронно-транспортной цепи. Долгое время считалось, что репарация ДНК в митохондриях отсутствует. И хотя для большинства путей репарации это действительно так, эксцизионная репарация оснований (ЭРО) протекает активно и важна для поддержания целостности митохондриальной ДНК.

ЭРО удаляет широкий спектр химических модификаций оснований ДНК. Этот процесс инициируется ферментами ДНК-гликозилазами. В связи с ограниченным числом белков, кодируемых в митохондриальном геноме, необходимость репарации ДНК в митохондриях подразумевает транспорт белков репарации, в том числе ДНК-гликозилаз, закодированных в ядерном геноме и синтезированных в цитоплазме.

Для многих ДНК-гликозилаз (8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, урацил-ДНК-гликозилаза, MUTYH и др.) известно существование отдельных ядерной и митохондриальной изоформ, однако ферментативные свойства неядерных форм остаются малоизученными. В связи с этим цель данной работы состояла в характеристике профиля активности ферментов ЭРО ДНК в ядре и в митохондриях клеток человека.

Исследования проводились на двух линиях раковых клеток человека – RPMI-8226 (клетки миеломы) и MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы), растущих в нормальных условиях и условиях окислительного стресса. Из клеток этих линий были приготовлены общий, цитоплазматический, митохондриальный и ядерные экстракты, в которых с использованием модельных субстратов была оценена активность ферментов ЭРО.

В ходе работы были обнаружены активности ДНК-гликозилаз, удаляющих основания 8-оксогуанина, урацила, дигидроурацила и гипоксантина, а также АП-эндонуклеазная активность в разных клеточных компар-

тментах в обеих проанализированных линиях клеток человека. В целом обе линии показывают схожее распределение активностей в клеточных компартментах. Количества ферментов репарации окисленных оснований наиболее вариабельны: удельная активность 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы в клетках RPMI-8226 максимальна в ядре, а в клетках MCF-7 – в митохондриях, где также наблюдается высокая активность ферментов репарации окисленных пиримидинов.

Обработка клеток разобщителем окислительного фосфорилирования динитрофенолом вызывает значительное повышение уровня активности ферментов, ответственных за репарацию продуктов дезаминирования азотистых оснований (урацила и гипоксантина), во всех фракциях, кроме митохондриальной. Обработка H_2O_2 вызывает значительное повышение уровня урацил-ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы, во всех фракциях, кроме ядерной, в то время как уровень активности ферментов репарации окисленных оснований повышается лишь в цитоплазме.

**О. С. Тутанов^{1,2}, С. Н. Тамкович^{1,2}, А. Е. Григорьева¹
Е. И. Рябчикова¹, П. П. Лактионов¹**

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКЗОСОМ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Актуальность: Поиск в крови маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток, является актуальной задачей молекулярной онкологии. Показано, что в кровотоке онкологических больных циркулируют экзосомы, секретируемые клетками опухолей, и содержащие биополимеры, характерные для этих клеток. Таким образом, исследование протеома экзосом крови онкологических больных позволяет получить новые данные о белках трансформированных клеток и выявить потенциальные белковые онкомаркеры, пригодные для клинической диагностики /мониторинга злокачественных новообразований.

Целью исследования является выявление белков экзосом, специфичных для рака молочной железы и последующее исследование диагностического потенциала измерения концентрации этих белков в крови для диагностики злокачественных новообразований молочной железы.

Материалы и методы: Кровь здоровых женщин (n=29) и больных раком молочной железы (n=11) была разделена на плазму и форменные элементы

крови, элюаты с поверхности клеток крови были получены по разработанному ранее протоколу (Tamkovich S., 2005, Clin. Chem.). Препараты экзосом из плазмы и элюатов с поверхности клеток крови были получены путем фильтрации через фильтры с диаметром пор 100 нм и последующих двух раундов ультрацентрифугирования при 100 000 g в течение 1,5 ч., и охарактеризованы при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и окрашивания конъюгатом белка А с наночастицами золота комплексов первичных антител против тетраспанинов на наличие маркеров экзосом CD-9, CD-24 и CD-63. Белки полученных препаратов экзосом разделяли при помощи электрофореза в градиентном ПААГ, мажорные и минорные белки идентифицировали при помощи масс-спектрометрического анализа.

Результаты: При помощи ТЭМ было показано, что экзосомы диаметром 30-70 нм присутствуют как в плазме, так и на поверхности клеток крови, при помощи иммунохимического окрашивания подтверждено наличие характерных для экзосом антигенов CD-9, CD-24 и CD-63. При помощи 10-20 % SDS-диск-электрофореза с последующим окрашиванием белков коллоидным серебром было установлено, что в полученных препаратах присутствуют белки с молекулярной массой от 8 до 250 кДа с преобладанием мажорных белков 20, 40, 55 и 100 кДа. Время-пролетная MALDI TOF/TOF и maXis 4G масс-спектрометрия позволила достоверно идентифицировать 18 белков экзосом плазмы крови: цитоплазматический актин, KIAA 0378, нинеины (изоформы CRA-d, CRA-h, 2), цитоспин, α -1-синтропин, сывороточный альбумин, α -2-макроглобулин, серотрансферин, эстрадиол-17 β -дегидрогеназа 12, митохондриальный метилтрансферазно-подобный белок 17, карбамоилфосфат синтаза, Serine/threonine- protein phosphatase 4 regulatory subunit, ядерный аутоантиген sp-100, β -кристаллин, трансмембранный белок 74B.

Выводы: Показано, что экзосомы циркулируют не только в плазме крови но и будучи связанными с поверхностью клеток крови. Отработаны все технологические этапы работы по получению и характеристике экзосом, протеомному анализу экзосомальных белков. Для достоверного сравнительного анализа белков экзосом онкологических больных и здоровых женщин необходимо продолжить исследование.

А. В. Черепанова¹, В. В. Власов¹, П. П. Лактионов^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Новосибирский научно-исследовательский институт патологии
кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ НА poly(I:C)-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ПЕРВИЧНЫМИ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ

Ранее было показано, что ДНК и олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) ингибируют poly(I:C)-индуцированную продукцию провоспалительных интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в первичных фибробластах человека и эффективность ингибирования зависит от нуклеотидной последовательности ДНК (Cherepanova et al, Immunobiology. 2013). Для выяснения механизмов ингибирующего действия ДНК/ОДН было исследовано влияние ДНК/ОДН на дцРНК-индуцированную продукцию ИЛ-6, ИЛ-8 и других иммуномедиаторов, активируемых по отличиям от ИЛ-6/8 механизмам.

В качестве клеток-мишеней были использованы poly(I:C)-активированные первичные эндотелиоциты из пупочной вены человека (HUVEC) и десневые фибробласты (GF), и трансформированные клетки человека (карцинома шейки матки – Hela и кератиноциты – A431). Для ингибирования неспецифического иммунного ответа были использованы ранее обнаруженные сиквенс-специфичные ОДН. Продукцию ИЛ-6 и ИЛ-8 оценивали методом иммуноферментного анализа, уровень экспрессии генов интерферона beta1 (*ifnb1*) и антибактериального пептида beta-дефензина 2 (*hbd2*) – SYBR Green ПЦР в реальном времени с использованием $2^{-\Delta\Delta C_T}$ метода и *gapdh* в качестве нормировочного гена.

Poly(I:C) активирует продукцию ИЛ-6 и ИЛ-8 во всех исследованных типах клеток. Обнаруженное ранее ингибирование poly(I:C)-индуцированной продукции интерлейкинов GF под действием специфических ОДН наблюдается также в HUVEC, Hela и A431. ОДН ингибируют poly(I:C)-индуцированную экспрессию *hbd2* в клетках A431 и экспрессию *ifnb1* в GF. Ингибирование экспрессии дефензинов под действием ОДН подтверждает тот факт, что ОДН влияют на функционирование транскрипционных факторов NFkB и AP-1, а ингибирование экспрессии интерферона beta1 – влияние на функционирование транскрипционных факторов IRF3 и IRF7. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ингибирование происходит на ранних стадиях сигнального каскада: до привлечения TRAF6, активирующего NFkB через полиубиквитини-

лирование TAB2 и TRAF3, отвечающего за фосфорилирование IRF3 и IRF7 TANK-связывающей киназой 1 (TBK1).

Д. В. Антонец, Д. С. Грудин

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

КОМПЛЕКС ПРОГРАММ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ И РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА ИСКУССТВЕННЫХ ПОЛИЭПИТОПНЫХ АНТИГЕНОВ

CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) играют важнейшую роль в защите организма от неопластических заболеваний и различных инфекционных агентов и, в первую очередь, от вирусных инфекций. При этом антигены распознаются специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами не как полноразмерные белки, а как короткие пептиды (длиной 8-12 аминокислотных остатков), ассоциированные с определенными молекулами МНС I класса. Антигенные пептиды образуются в результате расщепления эндогенно синтезированных белков протеасомой (или иммунопротеасомой). Полученные в результате процессинга пептиды с помощью транспортных белков – гетеродимеров TAP1/TAP2 (transporter associated with antigen processing) – переносятся в просвет эндоплазматического ретикула и связываются с молекулами МНС I класса, после чего транспортируются на поверхность клетки, где комплексы антигенных пептидов с молекулами МНС презентируются Т-лимфоцитам [1].

Считается, что аффинность связывания олигопептида с молекулой МНС в значительной степени определяет его иммуногенность [2], и что энергия связывания пептида с молекулой МНС может быть представлена в виде суммы вкладов индивидуальных аминокислотных остатков, входящих в состав пептида [3]. На основе данных о экспериментально определенной аффинности связывания олигопептидов с различными аллельными вариантами молекул МНС нами было создано программное обеспечение TEpredict, предназначенное для предсказания потенциальных Т-клеточных эпитопов в составе белковых антигенов. Сравнение TEpredict с рядом других аналогичных программ (ProPred1, SVRMHC, SVMHC, RankPep, SYFPEITHI) показало, что TEpredict им не уступает, а в ряде случаев превосходит их по качеству предсказаний [4]. Обновленная версия программы TEpredict позволяет предсказывать Т-клеточные эпитопы, рестриктированные любым аллельным вариантом молекулы HLA I класса, с помощью оригинальных регрессионных моделей, построенных с помощью метода релевантных векторов.

Как и взаимодействие пептидов с молекулами МНС, так и их связывание с комплексом ТАР является в достаточной мере специфичным и определяется аминокислотной последовательностью пептидов [5]. Сайты расщепления антигенов протеасомой и иммунопротеасомой также во многом определяются аминокислотной последовательностью антигенов [6]. В настоящее время известны вырожденные аминокислотные мотивы, определяющие эффективность сайтов (иммуно)протеасомного расщепления и мотивы, определяющие аффинность связывания олигопептидов с комплексом ТАР. Таким образом, при конструировании полиэпитопных антигенов следует учитывать, что аминокислотные остатки, фланкирующие эпитопы, способны в значительной степени влиять на их иммуногенность. Существуют экспериментальные данные, доказывающие, что использование в составе полиэпитопных конструкций спейсерных последовательностей, создающих сайты протеасомного расщепления между эпитопами и оптимизирующих взаимодействие пептидов с ТАР, в значительной степени увеличивает способность таких конструкций индуцировать цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ [7–9]. Но, не смотря на большое количество работ, посвященных конструированию полиэпитопных антигенных конструкций и исследованию их иммуногенности и протективности, предсказанию сайтов протеасомного расщепления, предсказанию связывания пептидов с ТАР, к настоящему моменту не было предложено ни одного алгоритма рационального дизайна полиэпитопных антигенов. То есть, алгоритма, позволяющего проектировать аминокислотную последовательность полиэпитопного антигена, подбирая наилучшие спейсерные последовательности для каждой пары эпитопов и оптимальное взаимное расположение эпитопов в рамках конструкции с учетом современных знаний о специфичности протеасомного процессинга антигенов и о взаимодействии пептидов с ТАР для увеличения иммуногенности целевого полиэпитопа. Таким образом, разработанное нами программное обеспечение PolyCTLDesigner является уникальным [10].

По сравнению с инактивированными и субъединичными вакцинами полиэпитопные антигены отличаются следующими преимуществами: они могут включать большое количество цитотоксических и хелперных Т-клеточных эпитопов из наиболее перспективных антигенов; полиэпитопы могут быть спроектированы с учетом распространенности различных алломорф молекул HLA в целевой человеческой популяции либо с учетом генетических особенностей конкретного пациента; из них могут быть исключены эпитопы из белков нормальных тканей человека; полиэпитопы сконструированы так, чтобы максимизировать эффективность процессинга и презентации большинства целевых эпитопов; для увеличения эффективности индукции ответа CD4⁺ Т-лимфоцитов целевые полиэпитопы содержат дополнительные сигнальные последовательности (N-концевой лидерный пептид, и C-концевой фрагмент белка LAMP-1 человека и т.д.). Такие конструкции могут быть использованы в виде ДНК-вакцин, рекомбинант-

ных антигенных полипептидов, вирусоподобных частиц и т.д., либо могут быть использованы для создания персонифицированных терапевтических клеточных вакцин на основе полученных *ex vivo* с помощью современных клеточных технологий сингенных антиген-презентирующих клеток или иммунокомпетентных эффекторных Т-лимфоцитов.

С использованием программ TEpredict и PolyCTLDesigner учеными ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были сконструированы три новых полиэпипотопных антигена ВИЧ-1. Была подтверждена способность данных антигенов индуцировать Т-клеточный иммунный ответ. С помощью данных программных продуктов был разработан полиэпипотопный антиген меланомы человека. В *ex vivo* модели Т-клеточного иммунного ответа была показана индукция антиген-специфического Т-клеточного ответа. Кроме того, на основе известных и предсказанных Т-клеточных эпитопов белков ErbB2/HER2 человека и маммаглобина 1, считающихся перспективными мишенями для иммунотерапии рака молочной железы, с использованием разработанного программного обеспечения была создана полиэпипотопная антигенная конструкция. Предварительные результаты изучения их иммуногенности/протективности в *ex vivo* модели Т-клеточного иммунного ответа позволяют надеяться на эффективность предложенного подхода для иммунотерапии онкологических заболеваний.

Список литературы

1. J. Neefjes, M. L. M. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke, "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 12, pp. 823–36, Dec. 2011.
2. C. Lundegaard, O. Lund, S. Buus, and M. Nielsen, "Major histocompatibility complex class I binding predictions as a tool in epitope discovery," *Immunology*, vol. 130, pp. 309–318, 2010.
3. K. C. Parker, M. A. Bednarek, and J. E. Coligan, "Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains.," *J. Immunol.*, vol. 152, no. 1, pp. 163–75, Jan. 1994.
4. D. V. Antonets and A. Z. Maksyutov, "TEpredict: Software for T-Cell epitope prediction," *Mol. Biol.*, vol. 44, no. 1, pp. 119–127, Mar. 2010.
5. B. Peters, S. Bulik, R. Tampe, P. M. Van Endert, and H.-G. Holzhtüter, "Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors.," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 4, pp. 1741–9, Aug. 2003.
6. R. E. Toes, A. K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N. P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwiderman, T. P. Dick, J. Müller, B. Schönfish, C. Schmid, H. J. Fehling, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, and H. Schild, "Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products.," *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2001.

7. B. D. Livingston, M. Newman, C. Crimi, D. McKinney, R. Chesnut, and A. Sette, "Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines.," *Vaccine*, vol. 19, no. 32, pp. 4652–60, Sep. 2001.

8. S. Cardinaud, R. Bouziat, P.-S. Rohrllich, S. Tourdot, L. Weiss, P. Langlade-Demoyen, A. Burgevin, S. Fiorentino, P. van Endert, and F. A. Lemonnier, "Design of a HIV-1-derived HLA-B07.02-restricted polyepitope construct.," *AIDS*, vol. 23, no. 15, pp. 1945–54, Sep. 2009.

9. S. I. Bazhan, L. I. Karpenko, T. N. Ilyicheva, P. A. Belavin, S. V. Seregin, N. K. Danilyuk, D. V. Antonets, and A. A. Ilyichev, "Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8⁺ T cell responses.," *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 7–8, pp. 1507–15, Apr. 2010.

10. D. V. Antonets and S. I. Bazhan, "PolyCTLDesigner: a computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens.," *BMC Res. Notes*, vol. 6, no. 1, p. 407, Jan. 2013.

А. Ю. Бакулина¹, А. Н. Чикаев¹, Н. В. Волкова²

*¹Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

²Алтайский государственный университет

ПОИСК СТРУКТУРНОГО СООТВЕТСТВИЯ МЕЖДУ ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ GP120 И ПЕПТИДАМИ- ИМИТАТОРАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ МЕТОДОМ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Несмотря на многолетние усилия мирового сообщества, вакцина против вируса иммунодефицита человека до сих пор не создана. Уже очевидно, что традиционные методы разработки вакцин не могут помочь защититься от этого патогена. Одной из причин этого является особое строение гликопротеинов, определяющих антигенный портрет вируса. Как правило, антитела, образующиеся в организме в ответ на проникновение вируса, не обладают протективными свойствами и не могут препятствовать распространению вируса от клетки к клетке. Важная цель в борьбе против пандемии ВИЧ – создание таких иммуногенов, которые вызывали бы нейтрализующие антитела широкого спектра действия.

Создать такие иммуногены может помочь метод фагового дисплея. Суть метода состоит в том, что из бактериофагов, несущих на своей поверхности пептиды со случайными вариациями аминокислотной последовательности, методом аффинной селекции отбираются обладающие наибольшим сродством к молекулам-мишеням. В качестве таких мишеней могут быть использованы в том числе и моноклональные антитела (МКА).

Ранее были отобраны фаговые клоны, специфично связывающиеся с МКА VRC01. Эти антитела обладают вирус нейтрализующей активностью против широкого спектра изолятов ВИЧ-1, и взаимодействуют с областью белка gp120, являющейся сайтом связывания вируса с CD4-клетками. Специфичность связывания выделенных бактериофагов с МКА VRC01 подтверждалась методом иммуноблотинга и конкурентной вируснейтрализации. В сыворотках животных, иммунизированных пептидами в составе бактериофагов, обнаруживались нейтрализующие анти-ВИЧ антитела, активные против нескольких штаммов, но их эффективность была сравнительно невелика. Для улучшения иммуногенных свойств пептидов требуется понимание того, как именно они имитируют фрагмент gp120, формирующий узнаваемый антителом VRC01 конформационный эпитоп. Эту задачу можно решить с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллизованных комплексов антитела с пептидами, но, учитывая высокую стоимость одного такого анализа и десятки отобранных фаговых клонов со специфичным взаимодействием, это было бы слишком затратно. Методы компьютерной биологии хотя и являются менее достоверными, тем не менее, позволяют выдвигать обоснованные предположения о структуре комплекса антитела с пептидами, что помогает в планировании дальнейших исследований.

Для поиска пептидов-имитаторов эпитопа, узнаваемого антителом VRC01, проводилась аффинная селекция фаговых клонов из двух библиотек. Одна из них содержала бактериофаги, экспонирующие рандомизированные линейные пептиды длиной 12 аминокислотных остатков (а.о.), в другой фаги несли пептиды длиной 7 а.о., замкнутых в кольцо дисульфидной связью. Структуру пептидов, входящих в состав отобранных из 12-мерной библиотеки фагов, сопоставили с поверхностью gp120. Использовались программа Reripore, предназначенная для картирования конформационных эпитопов методом фагового дисплея, и собственная аналогичная программа pdMap. Оказалось, что пептид VSWPELYKWTWS из самого распространенного клона имеет наибольшее сходство с фрагментом 365-371 гликопротеина gp120. Этот район gp120 непосредственно взаимодействует с клеточным рецептором CD4, что необходимо для проникновения вируса в клетку. Построение модели пространственной структуры комплекса пептида с антителом подтвердило возможность взаимодействия пептида именно в этом районе.

Для пептидов из кольцевой 7-мерной библиотеки с использованием тех же методов поиска соответствия не было найдено сходства с gp120 на уровне аминокислотных последовательностей, но результаты экспериментов говорят в пользу того, что значимое сходство существует. Модель комплекс пептида CSWTLLGYC с МКА была построена методом молекулярного докинга в программе Autodock Vina. В модели не было обнаружено видимого сходства структуры пептида с какими-либо фрагментами

gp120. При этом оказалось, что пептид непосредственно взаимодействует с аминокислотными остатками в районе третьей варибельной петли тяжелой цепи VRC01, описанными в литературе как важные для взаимодействия этого антитела с gp120.

С помощью методов компьютерного моделирования нами были сделаны предположения о том, как именно пептиды, отобранные методом фагового дисплея, способны имитировать гликопротеин gp120. Для пептидов из 7-мерной библиотеки не было обнаружено фрагментов gp120 со сходным аминокислотным составом. Для пептидов из 12-мерной библиотеки был найден аминокислотный мотив, обеспечивающий сходство с поверхностью gp120, но во взаимодействие пептида с антителами большой вклад явно вносят и аминокислотные остатки, находящиеся за пределами этого мотива. По всей видимости, пептиды имитируют эпитоп VRC01 не на аминокислотном уровне, и это необходимо учитывать при дальнейшей работе по исследованию антител широкого спектра действия и разработке иммуногенов.

С. В. Буряченко

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина
semenb837@gmail.com*

ГЕННО-БИОТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ. НАРУШЕНИЕ РАВНОВЕСИЯ ТАУТОМЕРНЫХ ФОРМ ДНК. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕФЕКТЫ. НОРМАЛИЗАЦИЯ ФУНКЦИЙ ДЕФЕКТНЫХ ГЕНОВ НЕПОСРЕДСТВЕННО В ОРГАНИЗМЕ

Генно-биотические модификации возникают вследствие воздействия на биомолекулы физико-химических факторов, что приводит к изменению химической структуры таутомерных форм молекул входящих в состав биомолекул клетки, что изменяет биохимические процессы оснований ДНК на молекулярном уровне и влечет к дефектному строению генов (изменению структуры). Возникает обратная изомерия молекул, атомы одних молекул устремляются к атомам других – от меньшего к большему содержанию тех или иных атомов в составе молекулы для того, чтобы обеспечить молекулу энергией. Нарушается состояние равновесия между таутомерами, изменяется положение атома, что влияет на образование водородных связей между парами оснований ДНК. Гены приобретают неправильную дефектную структуру. Нескорректированные изменения химической структуры генов, воспроизводимые в последовательных циклах репликации и проявляющиеся у потомства в виде новых вариантов признаков. Изменения структуры ДНК, образующей ген, можно разделить на

три группы. Мутации первой группы заключаются в замене одних оснований другими. Они составляют около 20% спонтанно возникающих генных изменений. Вторая группа мутаций обусловлена сдвигом рамки считывания, происходящим при изменении количества нуклеотидных пар в составе гена. Наконец, третью группу представляют мутации, связанные с изменением порядка нуклеотидных последовательностей в пределах гена (инверсии). В нашей работе мы описываем биохимический механизм концепции образования мутаций и дефектных генов и метод генетической регуляции дефектных генов в организме человека, восстанавливающий состояние физико – химического равновесия между таутомерами молекул ДНК, восстанавливающий положение атомов (эффект обратной изомерии).

Материалы и методы. В своих исследованиях мы использовали методы молекулярной генетики: сиквенирование, ПЦР, электрофорез, праймеры. Исследования проводились на специально выведенной линии крыс Вистар с дефектными генами и мутациями в геноме. Были получены мутации в генах R408W и другие. Первым этапом наших исследований было создание мутантных линий крыс Phaniu, Mucovi, Leycino, Onco, Porfiri и др. Создавали такие линии при внутриутробном развитии используя антагонисты жизненных биотиков. Проводили воздействие на таутомерную форму структуры гена кофермента Fe, использовали антагонисты железа при кормлении матери – скармливали в больших количествах кальций. При выведении линии животных с муковисцидозом – скармливали молибден и серу. Использовали ДНК – зонды для гибридизации с ДНК клеток пациента дает возможность выявлять у него соответствующие изменения в наследственном материале, т.е. диагностировать определенные виды генных мутаций (генодиагностика). Провели совершенствование методики молекулярной генетики обеспечивающая возможность полного определения нуклеотидных последовательностей не только структурных, но и регуляторных локусов генома человека, а разработка методов включения в человеческий геном нормальных нуклеотидных последовательностей разработанная нами, в перспективе может стать основой генотерапии. Восстановление дефектных генов мы проводили с помощью введения ДНК – вакцины (продукт генной инженерии), в основе которой полученные по специальной запатентованной технологии молекулярные белки крови с раствором кристаллов монтмориллонита и железа. Клетки печени культивируются в вакцине и пересаживаются в кровь пациента. Через 19 месяцев происходит полное восстановление.

Результаты и обсуждения. Весь процесс восстановления дефектных генов проходит в три этапа. Первый этап восстановления повреждений ДНК действует у многих видов организмов, включая человека, и состоит в том, что экспонирование в видимом свете клеток, предварительно обработанных УФ-излучением, приводит к снижению летального эффекта в несколько раз, т. е. к реактивации функций облученных клеток.

Это реактивирующее действие видимого света связано с расщеплением (мономеризацией) пиримидиновых димеров, причем этот процесс обеспечивается светозависимым фотореактивирующим ферментом. Другой механизм удаления димеров пиримидиновых оснований из ДНК облученных клеток получил название темновой репарации или вырезания – восстановления. Так же как и фотореактивация, он представляет собой ферментативный процесс, но более сложный, притом проходящий в темноте. Этот этап заключается в том, что тиминовые димеры подвергаются «вырезанию» из цепи ДНК, в которой остаются «бреши», «залатываемые» восстановительным синтезом ДНК при участии ДНК – полимеразы и использовании противоположной цепи в качестве шаблона.

Конечный этап в удалении пиримидиновых димеров из ДНК – облученных клеток путем «вырезания» и «залатывания» «брешей» состоит в смыкании вновь реплицированного участка ДНК с соседними поврежденными участками и «замазывании» сахарофосфатных скелетных связей посредством фермента ДНК – лигазы. Третий этап восстановления повреждений ДНК называют пострепликационным или рекомбинационным восстановлением. Он заключается в том, что синтез ДНК в УФ-облученных клетках идет с нормальной скоростью вдоль хромосомы лишь до димера, перед которым замедляется на несколько секунд, после чего начинается вновь, но на другой стороне димера. Поскольку ДНК – полимеразы перескакивают через димер, то в дочерней цепи образуется «брешь». Вследствие этого район, содержащий димер в одном дуплексе, будет интактным в сестринском дуплексе, т. е. в дочерних молекулах ДНК одна цепь содержит пиримидиновые димеры, тогда как в другой присутствуют бреши, которые фактически являются вторичными повреждениями. Следовательно, район, содержащий димеры в одном дуплексе, полностью сохраняется в сестринском дуплексе. Этот процесс заканчивается рекомбинацией вдоль молекулы ДНК после ее репликации, при которой дочерняя цепь, несущая в каком-либо участке «брешь», спаривается с другой дочерней цепью (комплементарной), несущей «брешь» в другом месте. Это спаривание позволяет провести восстановительный синтез, чтобы обеспечить восстановление правильной последовательности района в каждой бреши. В качестве шаблона используется соответствующий интактный район другой дочерней цепи. Рекомбинационные события на уровне каждой «бреши» приводят к реконструкции интактной молекулы ДНК, способной к дальнейшей репликации. В восстановлении ДНК принимают участие физические, химические и биологические факторы.

Выводы. Генно – биотические модификации нуклеотидов ДНК раскрывают подробный механизм возникновения патологического процесса, зависимость его от биогенов, что позволяет создать антимуtagenный регулирующий дефектные гены препарат ДНК вакцину. Лечебный эффект реализуется путем возобновления функции дефектного гена исправляя его, разблокировав и дополняя недостающей частью. Он нормализует работу дефектных генов и эффективно лечит многие наследственные генетические заболевания. Создание и применение нового препарата доставки непосредственно в клетку к определенному участку генома, гена. Нами был создан новый класс лекарственных средств, направленных на нормализацию генов, для исправления генетических врожденных и приобретенных дефектов, для восстановления функций тканей и органов человеческого организма. Срок восстановления дефектных генов и наступление исчезновения симптомов заболевания 19 месяц после начала генотерапии.

Препарат дает следующие преимущества в лечении больных:

Лечение наследственных заболеваний обмена веществ (фенилкетонурия, муковисцидоз, лейциноз, порфирия, болезнь Гоше, рак, заболевания крови);

Нормализует работу генов;

Целевая доставка препарата непосредственно к генам;

Технология генетической регуляции человеческого организма;

Универсальная прививка для ДНК;

Извлечение из клеток нужных веществ.

А. Е. Григорьева¹, С. Н. Тамкович¹, А. В. Еремина²

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Новосибирский филиал «Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России*

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ И ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ

Цели и задачи

Проведение диагностических процедур при офтальмологических заболеваниях осложняется самой природой органа зрения, и единственным легко доступным для анализа субстратом является слезная жидкость (СЖ) – постоянная микросреда переднего отдела глаза, процесс сбора которой безопасен. В последние десятилетия предпринимаются попытки использовать СЖ для диагностики патологических состояний органа зрения. Была показана высокая информативность исследований физико-

химических, биохимических и иммунологических параметров СЖ для понимания патогенеза многих офтальмологических заболеваний.

Активно развивающимся направлением диагностических исследований является анализ микрочастиц, включая экзосомы, в биологических жидкостях. Экзосомы – везикулы (40-100 нм), формирующиеся в мультивезикулярных тельцах и выделяющиеся во внеклеточное пространство. Экзосомы передают сигналы между клетками и таким образом участвуют в развитии патологических процессов. Многими исследованиями было показано, что экзосомы несут на своей поверхности маркеры различных заболеваний (Vlassov, 2012). Экзосомы присутствуют во многих биологических жидкостях, на сегодняшний день разработаны и активно используются в исследованиях методы их выделения и концентрирования из крови и мочи. Анализ научной литературы показал, что экзосомы СЖ не исследованы с помощью электронно-микроскопических и молекулярно-биологических методов, не описаны методы их выделения и концентрирования. Ранее нами было показано присутствие микрочастиц, в том числе по морфологии соответствующих экзосомам, в СЖ здоровых людей и людей с офтальмологическими заболеваниями (Григорьева, Еремина et al. 2014). В связи с этим стало необходимым проведение детального изучения выделенных микрочастиц и экзосом, как электронно-микроскопическими, так и молекулярно-биологическими методами.

Материалы и методы

Образцы слезной жидкости

В исследование были вовлечены клинически здоровые доноры (n=18, возраст от 45 до 60 лет), пациенты с диабетической ретинопатией (ДР) (n=13, возраст от 45 до 60 лет) и больные глаукомой (n=14, из которых у 3 была начальная стадия заболевания, у 4 – развитая и у 7 – далекозашедшая, возраст от 50 до 75 лет). На проведение исследования было получено информированное согласие всех пациентов и разрешение комитета по биомедицинской этике Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» (г. Новосибирск). Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан.

Забор СЖ (0,3-0,4 мл) проводили из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку, как описано ранее (Григорьева, Еремина et al. 2013). Образцы СЖ центрифугировали при 20000g в течение 10 мин, супернатанты и осадки изучали с помощью электронной микроскопии.

Выделение экзосом из СЖ

Аликвоту супернатанта СЖ фильтровали через фильтр с размером пор 100 нм. После этого образцы подвергали двойному ультрацентрифугированию в течение 1,5 ч при 100000g (Beckman L8-70M Ultracentrifuge) при

4°C. Полученные образцы экзосом замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C.

Иммуноцитохимическое исследование экзосом

Аликвоту образцов экзосом смешивали с первичными моноклональными антителами против CD63, CD24 и CD9 (Abcam) и инкубировали в течение 18 ч на шейкере Elpan 358S, после чего сорбировали на медные сетки. Далее препарат инкубировали с конъюгатом белка А и наночастиц золота в течение 2 ч. Затем препарат контрастировали ФВК.

Электронная микроскопия (ЭМ)

Полученные аликвоты супернатантов и выделенные экзосомы исследовали методом негативного контрастирования (НК). Полученные осадки обрабатывали стандартным методом и изучали методом ультратонких срезов. Образцы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Japan) с цифровой фотокамерой Veleta (SIS, Germany).

Спектр молекулярного веса белков экзосом СЖ

Для оценки спектра молекулярного веса белков экзосом СЖ, аликвоту экзосом лизировали в буфере, содержащем 0,2 М DTT, 8% SDS, 250 мМ трис-НСl, рН 6,8. Далее образцы подготавливали для нанесения на 10-20% градиентный SDS-ПААГ. После проведения SDS-диск электрофореза с помощью блоттинга переносили белки из геля на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали коллоидным серебром.

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование показало, что все образцы супернатантов СЖ содержат микрочастицы, имеющие мембранную оболочку. Наибольшее содержание микрочастиц выявлено в образцах СЖ больных ДР и далекозашедшей глаукомой. Наименьшее – в СЖ больных с начальной и развитой стадией глаукомы, тогда как у здоровых доноров отмечено среднее количество микрочастиц. Морфология микрочастиц изменяется в зависимости от заболевания. В СЖ здоровых людей основная доля микрочастиц имела округлую чашеобразную форму и гладкую поверхность. У больных далекозашедшей глаукомой и диабетической ретинопатией в СЖ присутствуют микрочастицы, окруженные капсулой из материала низкой электронной плотности.

Методом негативного контрастирования показано, что во всех препаратах экзосом (рис. 1), полученных концентрированием СЖ, присутствуют частицы округлой формы, диаметром 40-100 нм, что соответствует описанию экзосом в научной литературе. Обнаруженные микрочастицы были исследованы иммуноцитохимическим методом с использованием первичных антител против рецепторов CD9, CD24 и CD63 с последующим выявлением позитивно окрашенных везикул конъюгатом белка А с наночастицами золота. Подавляющая часть частиц показала связывание с конъюгатом Au-белок А. Это указывает на наличие белков CD9, 24 и 63 на их поверхности (рис.1б-г) и подтверждает, что выделенные микрочастицы

являются экзосомами. Таким образом, использованный метод ультрацентрифугирования позволяет выделять и концентрировать экзосомы СЖ.

Исследование спектра молекулярной массы белков лизированных экзосом СЖ установило широкий набор белков с диапазоном молекулярных масс от 12 до 85 kDa. Спектр белков образцов экзосом СЖ больных глаукомой, больных диабетической ретинопатией и здоровых доноров не отличается. Мажорные белки в экзосомах по электрофоретической подвижности соответствуют лактоферрину, человеческому сывороточному альбумину и лизоциму, представлены также белки с молярным весом 65, 60, 20 и 12 кДа.

Изучение ультратонких срезов осадков СЖ людей выявило эпителиальные клетки и лейкоциты, волокнистый матрикс и клеточный детрит. Эпителиальные клетки содержались в 67% образцов здоровых доноров, в то время как у больных с далекозашедшей глаукомой они не встречаются никогда, а у больных ДР были единичны. Полиморфноядерные лейкоциты обнаруживались только в образцах СЖ больных ДР, что может быть следствием повреждения сосудов или развития воспаления. Примечательно наличие особых везикул, несущих на поверхности белковые нити, которые встречаются во всех образцах больных далекозашедшей глаукомой и у 70% больных ДР. Интересно, что у больных с начальной и развитой стадией глаукомы данные везикулы не встречаются, и лишь 15% образцов СЖ здоровых доноров содержат такие везикулы.

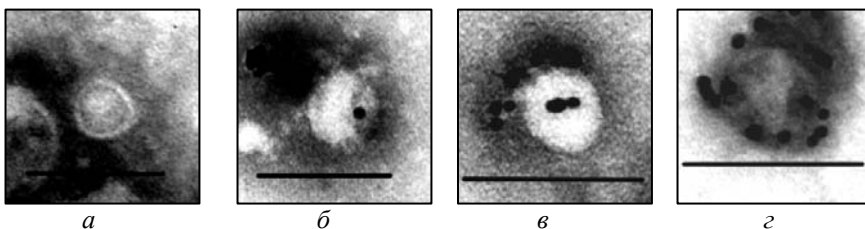


Рис. 1. *а* – экзосома СЖ здорового донора; *б–г* – экзосомы, экспрессирующие белок CD63 (обработка антителами против CD63 и конъюгатом белок А – наночастицы золота). *б* – экзосома СЖ здорового донора, *в* – больного далекозашедшей глаукомой, *г* – больного ДР. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование

Заключение

Полученные результаты подтверждают наличие экзосом в СЖ людей и пригодность использованного метода концентрирования для выделения экзосом СЖ. Структурные компоненты СЖ изменяются при офтальмологических заболеваниях, что говорит о высоком диагностическом потен-

циале СЖ и необходимости дальнейших исследований с привлечением разнообразных современных методов.

Список литературы

Григорьева, А. Е., А. В. Еремина, et al. (2013). "Диагностический потенциал электронно-микроскопического анализа слезной жидкости людей." *Офтальмохирургия* 4: 104-107.

Григорьева, А. Е., А. В. Еремина, et al. (2014). "Ультراструктурный анализ слезной жидкости у пациентов с диабетической ретинопатией." *Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук* 34(3): 31-36.

**К. А. Иванова, Д. В. Шаньшин
А. А. Сергеев, Д. Н. Щербаков**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ ИММУННОЙ БИБЛИОТЕКИ ФАГОВЫХ МИНИ-АНТИТЕЛ ПРОТИВ ОРТОПОКСВИРУСОВ

В мире существует ряд заболеваний, для которых до сих пор не создано вакцин. К ним относятся аутоиммунные, онкологические заболевания, а также заболевания, вызываемые рядом инфекционных агентов, в том числе, особо опасными инфекциями. В 1980 г. ВОЗ заявила об эрадикации натуральной оспы. Этот результат достигнут профилактическими мерами, терапевтические препараты так и не были созданы. В последние годы наблюдается подъем заболеваемости, обусловленный другими ортопоксвирусами, патогенными для человека – вирусом оспы обезьян и вирусом оспы коров. Особую обеспокоенность вызывает возможность применения вирусов в качестве агента биотеррористической атаки. Поскольку массовая вакцинация требует больших человеческих и материальных ресурсов, а существующая вакцина имеет побочные эффекты, это делает актуальным разработку терапевтических средств против ортопоксвирусов.

Перспективными антивирусными препаратами являются рекомбинантные моноклональные антитела. Одним из основных путей получения таких антител является технология фагового дисплея, которая, с использованием *invitro* аффинной селекции, позволяет выявлять последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антител, распознающих мишень с высокой точностью. Основой фагового дисплея являются обширные библиотеки антител, позволяющие вести поиск желаемого варианта антитела. Библиотеки создаются путем клонирования генов вариабельных

доменов тяжелой и легкой цепей антител в составе конструкции на основе фагмидных векторов.

В данной работе нами сконструирован фагмидный вектор для дисплея фрагментов антител человека против ортопоксвирусов. Экспериментально подтверждена его способность обеспечивать корректный дисплей вариабельных фрагментов антител на поверхности фаговых частиц.

За основу конструкции была взята плазмида pBluescript II SK +. Из полилинкера плазмиды были удалены два сайта рестрикции, которые ограничивали возможность встройки целевых нуклеотидных последовательностей. Для последующего клонирования с использованием сайто-направленного мутагенеза была введена нуклеотидная последовательность, соответствующая сайту рестрикции AgeI. Для первичного анализа полученных клонов был проведен рестрикционный анализ. Данные геле-электрофореза продуктов гидролиза ДНК показали наличие введенного сайта, и успешное удаление ограничивающих встройку сайтов. Для окончательного подтверждения этих результатов было проведено определение нуклеотидной последовательности плазмидной ДНК отобранных клонов.

В состав полученного вектора была встроена синтетическая последовательность ДНК, содержащая сайты для клонирования «генов» вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей антител, а также дополнительные регуляторные элементы, обеспечивающие эффективную экспрессию.

Для оценки адекватной сборки вариабельных фрагментов тяжелой и легкой цепей на поверхности фаговых частиц был получен рекомбинантный аналог иммунодоминантного продукта гена H3L вируса осповакцины. Для клонирования и экспрессии гена H3L использовали вектор pET15b. Встройку нуклеотидной последовательности гена проводили по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. Наличие встройки подтверждали ПДРФ анализом и определением нуклеотидной последовательности.

В фагмидный вектор были встроены нуклеотидные последовательности, соответствующие вариабельным фрагментам антитела, взаимодействующего с белком H3L. Аминокислотный состав вариабельных фрагментов этого антитела был опубликован ранее.

В результате работы сконструирован вектор, который будет использован для получения библиотек мини-антител человека. Также получен рекомбинантный белок ортопоксвирусов в качестве мишени для оценки адекватной сборки мини-антител на поверхности фаговых частиц.

М. Ю. Карташов

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

**ИЗУЧЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РИККЕТСИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛЕЩЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ
РОССИИ**

Риккетсии – обширная группа мелких полиморфных грамотрицательных бактерий, являющихся облигатными внутриклеточными паразитами, которые не растут на искусственных питательных средах и размножаются только в клетках живых организмов. Многие риккетсии вызывают болезни человека и животных, поражая чаще всего ретикулярную ткань и эндотелий сосудов. Хозяином и переносчиком данного патогена в природных условиях являются членистоногие. В инфекционной патологии человека основное значение имеют риккетсии группы сыпного тифа (*R. prowazekii*, *R. typhi*), которые являются одной из наиболее важных эпидемических инфекций с исторической точки зрения. Вторая группа инфекций, вызываемых риккетсиями – клещевые пятнистые лихорадки (*R. rickettsi*, *R. conori*, *R. sibirica*, *R. japonica* и др.). Внедрение современных молекулярно-биологических методов исследования привело к открытию новых видов и подвидов риккетсий, патогенных для человека, а также описанию новых риккетсиозных синдромов. В настоящее время в России регистрируют заболевания только двумя риккетсиозами из группы клещевой пятнистой лихорадки: североазиатский клещевой риккетсиоз, вызываемый *R. sibirica* и распространенный преимущественно в азиатской части России, и астраханская пятнистая лихорадка, встречающаяся в Астраханской области и вызываемая *R. conori subsp. caspia*. Однако, научные исследования, проводимые с использованием современных молекулярно-биологических методов позволяют обнаруживать в клещах, собранных на территории России, генетический материал и других патогенных для человека видов риккетсий (*R. heilongjiangensis*, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*), а так же риккетсий с неустановленной патогенностью (*Candidatus R. tarasevichiae*, *Rickettsia sp. RpA4*, *Rickettsia sp. DnS14*, *Rickettsia sp. DnS28*). Эти данные свидетельствуют о высокой актуальности исследований по изучению генетического разнообразия риккетсий, циркулирующих на территории России и необходимости уточнения вопроса о роли риккетсий новых генотипов в инфекционной патологии. Уточнение спектра циркулирующих в регионах риккетсий и их возможных переносчиков имеет огромное значение для совершенствования диагностики клещевых риккетсиозов и дальнейшей разработки средств специфической профилактики этих заболеваний.

Цель данного исследования состояла в изучении распространения и видового разнообразия риккетсий в клещах, собранных в различных биотопах на территории России. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

Детекция генетического материала риккетсий в клещах с целью определения процента зараженности переносчика риккетсиями.

Генетическое типирование выявленных положительных образцов путем определения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gltA*, кодирующего цитратсинтазу.

Для риккетсий, относящихся к группе клещевой пятнистой лихорадки, дополнительно определение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *ompA* и *ompB*, кодирующих белок А наружной мембраны и белок В наружной мембраны, соответственно.

Проведение филогенетического анализа определенных нуклеотидных последовательностей и оценка генетического разнообразия риккетсий, циркулирующих на территории различных природных очагов.

В исследование было взято 4252 клещей различных видов и стадий развития.

Отлов клещей на территории Томской области за период 2010-2012 гг. (N=3271; виды *Ix. persulcatus* и *Ix. pavlovskyi*) проведен сотрудниками кафедры зоологии позвоночных и экологии Томского государственного университета (зав. кафедрой – д.б.н. Москвитина Н.С.). Отлов клещей на территории Республики Коми за период 2011-2013 гг. (N=676; вид *Ix. persulcatus*) проведен сотрудниками ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора, г. Сыктывкар (рук. – д.м.н. Корабельников И.В.). Отлов клещей на территории Новосибирской области за период 2008-2012 гг. (N=305; виды *Ix. persulcatus*, *Ix. pavlovskyi*, *Dermacentor spp.*) проведен сотрудниками лаборатории генной инженерии НИИБХ СО РАМН (зав. лаб. – д.б.н. Беклемишев А.Б.) и сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ ГНЦ ВБ «Вектор» (зав. лаб. – к.б.н. Терновой В.А.). Первичный скрининг клещей на наличие генетических маркеров риккетсий проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием пары праймеров и зонда, специально разработанных нами для этой цели. Положительные образцы использовали для генетического типирования риккетсий по фрагментам генов *gltA* (760 н.), *ompA* (1500 н.) и *ompB* (1480 н.). Все полученные ДНК-фрагменты были секвенированы, и их последовательности были использованы для проведения филогенетического анализа.

По результатам исследования методом ПЦР уровень зараженности риккетсиями клещей видов *Ix. persulcatus* и *Ix. pavlovskyi* в Томской области составил, соответственно, $6,8 \pm 0,4$ % и $6,1 \pm 0,6$ %. ДНК риккетсий обнаружена в $7,5 \pm 1,1$ % образцах клещей, отловленных в Республике Коми. Показатель зараженности риккетсиями клещей рода *Ixodes* в Новосибир-

ской области составил $13,1 \pm 2,2$ %, для клещей рода *Dermacentor* – $38,2 \pm 5,4$ %.

Анализ нуклеотидных последовательностей генов *gltA*, *ompA* и *ompB* позволил генотипировать изучаемых риккетсий. Обнаружено, что на территории Томской области циркулирует *Candidatus R. tarasevichiae*. Эта риккетсия наиболее близка к виду *R. canadensis*, которая была изолирована из клещей *Haemaphysalis leporispolustris* в Канаде (Онтарио) в 1963 г. и ответственна за случаи острого церебрального васкулита в странах Северной Америки. Этот факт позволяет предположить, что *Candidatus R. tarasevichiae* может оказаться патогеном и быть ответственной за ряд случаев инфекций с клинической картиной, нетипичной для известных клещевых инфекций, которые регистрируют в ареале *Ix. persulcatus*. В 2013 г. появилось первое сообщение о патогенности *Candidatus R. tarasevichiae* для человека. В образцах крови от 5 пациентов, госпитализированных на северо-востоке Китая после укуса клеща, методом ПЦР была выявлена ДНК этой риккетсии. Циркуляция *Candidatus R. tarasevichiae* в иксодовых клещах показана также для Новосибирской области и Республики Коми. Возможно, географическое распространение этого вида риккетсий совпадает с ареалом *Ix. persulcatus*, который населяет биотопы южной тайги и смешанных лесов в Евразии от западной границы России до Дальнего Востока. На примере Томской области показано, что переносчиком *Candidatus R. tarasevichiae* могут также выступать клещи вида *Ix. pavlovskyi*.

На территории Республики Коми выявлена циркуляция *R. helvetica*, которая встречается гораздо чаще, чем *Candidatus R. tarasevichiae*. Генетический материал этой риккетсии был определен и в некоторых клещах, собранных в Новосибирской области. *R. helvetica* широко распространена во многих европейских странах, таких как Франция, Швеция, Великобритания, Испания, Италия, Польша, а также обнаруживается в клещах, собранных на территории Японии. В 2000 г. в Восточной Франции был описан случай лихорадочного заболевания неясной этиологии с сероконверсией к *R. helvetica*. В Швеции этот вид риккетсий оказался причастным к случаям острого перимеокардита с летальным исходом у двух подростков. Согласно современным литературным данным *R. helvetica* следует относить к так называемой группе «новых патогенов».

Более чем в трети клещей рода *Dermacentor*, которые были собраны в пригороде Новосибирска, обнаружена ДНК *R. raoultii*. Данный вид риккетсий широко распространен в Европе (Франция, Испания, Германия, Венгрия, Польша), встречается также в Азии и Северной Африке. В настоящее время роль *R. raoultii* в качестве этиологического агента синдрома TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy; лимфаденопатия, передающаяся клещами) подтверждена серологическими методами и выявлением ДНК в крови больных.

Уровень гомологии по фрагменту гена *gltA* всех изученных изолятов *Candidatus R. tarasevichiae* составил 100 % с изолятами, ранее обнаруженными в Западной Сибири (DQ168981) и Восточной Сибири (DQ168982), а также в Китае (JX996054). Образцы *R. helvetica* из Новосибирской области имеет 100 % гомологию по фрагментам генов *gltA* и *ompB* с риккетсиями, циркулирующими в Германии (HQ232251) и в Румынии (JX683116). Однако, образцы *R. helvetica* из Коми по фрагменту гена *gltA* имеют уровень сходства с другими риккетсиями этого вида 99,9 % и характеризуются синонимичной транзицией CTC→CTT в третьей позиции кодона, кодирующего Leu344 цитратсинтазы по сравнению с известными прототипами (U59723, DQ131912, EU359285). Гомология образцов *R. helvetica* из Республики Коми по фрагменту гена *ompB* составила 99,8 % с другими прототипами, выделенными в Швейцарии (AF123725), в Германии (HQ232251) и в Румынии (JX683116). По сравнению с перечисленными изолятами у образцов из Коми имеется одна синонимичная транзигция (AAT→AAC) в третьем положении кодона, кодирующего Asn773 и две несинонимичные транзигции. Транзигция в первом положении кодона GTT→ATT приводит к замещению Val926 на Ile926, а GGT→AGT приводит к замещению Gly1219→Ser1219. Изоляты *R. raoultii* из Новосибирской области по фрагментам генов *gltA* и *ompB* на 100 % гомологичны ранее описанным изолятам, циркулирующим в Европе (DQ365803, AF120029 – для *gltA*; JX683119, HQ232221 – для *ompB*). Изоляты *R. raoultii* из Новосибирской области характеризуются синонимичной транзицией GGC→GGT в третьей позиции кодона, кодирующего Gly97 цитратсинтазы, по сравнению с *R. raoultii*, обнаруженной в Хабаровском крае (DQ365804).

Таким образом, полученные данные подтверждают широкое распространение риккетсий, переносимых клещами на исследованных территориях, их разнообразный видовой состав и поднимают вопрос о необходимости коррекции существующих методов дифференциальной диагностики вызываемых ими инфекций.

**Е. В. Кашина, Е. В. Антонцева, Е. А. Ощепкова, Д. Ю. Ощепков
Д. П. Фурман, В. А. Мордвинов**

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

**ВРЕМЕННЫЕ И ДОЗОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ
2,3,7,8-ТЕТРАХЛОРДИБЕНЗО-ПАРА-ДИОКСИНА
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В МАКРОФАГЕ ***

Введение. В связи с нарастающей индустриализацией современного общества увеличивается и количество ксенобиотиков, способных негативно воздействовать на организм человека [Rutkowski, 2014]. 2,3,7,8-тетрахлордидибензо-пара-диоксин (диоксин) относится к группе стойких органических загрязнителей и является самым токсичным среди ксенобиотиков, вызывая широкий спектр биологических ответов, включая также иммунотоксичность и рак [Rysavy, 2013]. Макрофаги являются ключевыми регуляторами врожденного иммунного ответа, и, располагаясь во всех органах и тканях организма, одними из первых встречаются с ксенобиотиками. Показано, что нарушение функций, выполняемых макрофагами – один из факторов развития аутоиммунных и сердечно-сосудистых заболеваний, метаболических расстройств, а также могут способствовать прогрессированию раковых заболеваний, в случае приобретения фенотипа, называемого «опухоль-ассоциированным». В связи с перечисленным выше, изучение влияния ксенобиотиков и, в частности, диоксина, на изменение функционального состояния макрофагов может прояснить механизмы прогрессии многих заболеваний, включая рак. Показано, что воздействие диоксина, как иммунотоксиканта, на макрофаги изменяет экспрессию ряда цитокинов (IL1 β , IL8, TNF- α ...) и транскрипционных факторов (CEBP β , IRF3...) [Beischlag, 2008]. Однако биоинформатический анализ, проведенный ранее нашей группой, показал, что список цитокинов и транскрипционных факторов, чья экспрессия может модулироваться воздействием диоксина, может быть значительно расширен [Furman, 2009]. Токсическое действие диоксина реализуется через систему арил-гидрокарбонового рецептора (AhR), лиганд-активируемого транскрипционного фактора. В отсутствие лиганда AhR находится в цитоплазме клетки в комплексе с димером белков-шаперонов Hsp90, кошапероном p23 и белком AIP. После связывания с лигандом комплекс перемещается в ядро и диссоциирует, а оставшийся связанным с лигандом AhR димеризуется с белком AhR

* Работа была поддержана грантом РФФИ № 12-04-01736-а и бюджетными проектами № VI.60.1.1 и VI.61.1.2.

Nuclear Translocator (ARNT). Комплекс лиганд/AhR/ARNT функционирует как транскрипционный фактор, связываясь со специфическими последовательностями, называемыми dioxin responsive elements (DRE), расположенными в регуляторных районах генов-мишеней (Connor, 2006).

С помощью биоинформатического метода SITECON были исследованы регуляторные районы генов ключевых цитокинов и их субъединиц, синтезируемые макрофагом человека: *IL12A*, *IL12B* и *IL4*. Известно, что *IL12* стимулирует провоспалительный ответ и индуцирует продукцию интерферона гамма, в то время как *IL4*, наоборот, стимулирует противовоспалительный ответ (Biswas, 2012). В промоторах этих генов были обнаружены потенциальные DRE, ответственные за реакцию клетки на воздействие диоксина. На основании этих исследований нашей группой была проделана работы по изучению влияния диоксина на экспрессию генов *IL12A* (*p35*), *IL12B* (*p40*) и *IL4* в макрофаге.

Материалы и методы. В качестве модельного объекта использовалась перевиваемая клеточная линия моноцитов человека U937 (получена из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор»), которая демонстрирует макрофагальный фенотип после обработки 4-форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА). Полученные макрофагоподобные клетки обрабатывались 10 нМ концентрацией диоксина (опыт) или 0,1%(v/v) диметилсульфоксидом (контроль) в течение 1, 3 и 6 часов. Полученная суммарная РНК и ядерный белковый экстракт подвергались анализу. Связывание транскрипционного комплекса Диоксин:AhR:Arnt из ядерного экстракта с двухцепочечными олигонуклеотидными с ³²P-меченым зондами, содержащими потенциальные DRE, изучали используя метод гель-ретардации. Выделенную РНК использовали для изучения изменений в уровнях экспрессии *IL12A*, *IL12B*, *IL*, *ATF3* и *CYP1A1* генов с помощью ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I.

Полученные результаты. Гель-ретардация с олигонуклеотидами, содержащими потенциально активные DRE, соответствующие сайтам из промоторных районов *IL12A*, *IL12B*, *IL4* генов, контрольными олигонуклеотидами и антителами к AhR подтвердила, что AhR вовлечен в образование ДНК/белковых комплексов. Результаты ПЦР-РВ, полученные после воздействия воздействию 10 нМ концентрации диоксина на U937 макрофагоподобные клетки, также как на первичные человеческие, полученные из моноцитов, макрофаги, демонстрируют модуляцию уровней экспрессии этих генов и позволяют сделать вывод о функциональности предсказанных DRE.

Заключение. Полученные результаты позволяют нам предложить двойной механизм регуляции экспрессии генов *IL12A*, *IL12B* и *IL4* при воздействии диоксина. Сначала происходит прямая активация его транскрипции диоксин-содержащим комплексом арил-гидрокарбонowego рецептора через DRE в их регуляторных районах, однако в последующем, вследствие ок-

сидативного стресса, вызванного воздействием диоксина, увеличивается экспрессия ATF3, что ведет к существенному снижению экспрессии как *IL4*, так и *IL12*. Совокупность полученных нами результатов (активация важного для метастазирования опухоли ATF3 (Wolford, 2013) и наблюдаемое подавление экспрессии имеющего противоопухолевый эффект *IL12*), также как проведенный анализ литературных данных позволяет сделать вывод о том, что диоксин может сдвигать функциональную активность макрофагов в сторону опухоль-ассоциированного фенотипа, таким способствуя прогрессированию раковых заболеваний.

Список литературы

1. Wolford CC, McConoughey SJ, Jalgaonkar SP, Leon M, Merchant AS, Dominick JL, Yin X, Chang Y, Zmuda EJ, O'Toole SA, Millar EK, Roller SL, Shapiro CL, Ostrowski MC, Sutherland RL, Hai T: Transcription factor ATF3 links host adaptive response to breast cancer metastasis. *J Clin Invest* 2013,123(7):2893-906.
2. Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH: The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008, 18(3):207-50.
3. Rutkowski K, Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Sulkowski S, Rutkowski R: Allergic diseases: the price of civilisational progress. *Postepy Dermatol Alergol* 2014, 31(2):77-83.
4. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim JY: Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res* 2012, 53(1-3):11-24.
5. Furman DP, Oshchepkova EA, Oshchepkov DY, Shamanina MY, Mordvinov VA: Promoters of the genes encoding the transcription factors regulating the cytokine gene expression in macrophages contain putative binding sites for aryl hydrocarbon receptor. *Comput Biol Chem* 2009, 33(6):465-8.
6. Connor KT, Aylward LL: Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2006, 9(2):147-71.

А. А. Косова, С. Н. Ходырева, О. И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ KU-АНТИГЕНА
С АПУРИНОВЫМИ / АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ
ЗАВИСИТ ОТ СТРУКТУРЫ ДНК ***

Апуриновые / апиримидиновые (АР-) сайты являются одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК. Особый интерес представляет репарация АР-сайтов в составе кластерных повреждений ДНК, представленных комбинацией АР-сайтов, окисленных оснований и разрывов в пределах 1-2 витков спирали ДНК. Такие повреждения возникают в ДНК под действием ионизирующего излучения и лекарственных препаратов-радиомиметиков.

Целью данного исследования являлась идентификация белка клеточных экстрактов человека, специфично взаимодействующего с АР-сайтом в составе частичного ДНК-дуплекса, содержащего выступающие одноцепочечные 5'- и 3'-концы длиной по 8 нуклеотидов и имитирующего кластерное повреждение ДНК. В работе использовали сшивку белков с АР-ДНК в присутствии боргидрида натрия, опосредованную образованием основания Шиффа, в комбинации с гель-электрофорезом и MALDI-TOF масс-спектрометрией.

Белок клеточных экстрактов человека, который формирует преобладающий ковалентный аддукт с молекулярной массой около 100 кДа с АР-ДНК с выступающими концами, идентифицирован как Ku80-субъединица Ku-антигена методом пептидного картирования на основе данных MALDI-TOF масс-спектрометрии. Ku-антиген, состоящий из двух субъединиц с молекулярными массами около 70 кДа (Ku70) и 83 кДа (Ku80), является эукариотическим ДНК-связывающим компонентом ДНК-зависимой протеинкиназы. Ku-антиген играет ключевую роль в репарации двухцепочечных разрывов в ДНК по пути негомологичного соединения концов. Ранее нами было установлено, что Ku80-субъединица Ku-антигена формирует преобладающий продукт сшивки с молекулярной массой около 90 кДа с АР-ДНК-дуплексом с тупыми концами (Irina *et al.*, 2008).

Появление аддукта Ku80 с более низкой электрофоретической подвижностью, характерного для АР-ДНК с выступающими концами, может быть обусловлено существованием двух разных типов связывания Ku80 с ДНК или высокоэффективной сшивкой ДНК с другой изоформой Ku80. Показа-

* Работа поддержана РФФИ (13-04-01426) и Программой РАН «Молекулярная и клеточная биология».

но, что Ку-антиген, выделенный из клеток HeLa, формирует ковалентные аддукты имеющие ту же подвижность, что и аддукты, образующиеся в экспериментах с использованием клеточных экстрактов. Таким образом, Ku80-субъединица Ку-антигена может специфично взаимодействовать с AP-ДНК, формируя аддукты, электрофоретическая подвижность которых зависит от структуры концов ДНК. Различие в электрофоретической подвижности может быть обусловлено сшивкой AP-ДНК с разными аминокислотными остатками белка, что может указывать на неодинаковое расположение различных типов AP-ДНК в комплексе с Ку-антигеном.

**В. В. Кузнецова, С. В. Кулемзин, Е. С. Решетникова
О. Ю. Волкова, Л. В. Мечетина, А. В. Таранин**

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

РОЛЬ В-ЛИМФОЦИТАРНОГО ШАПЕРОНА FCRLA В КОНТРОЛЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В-ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ *

Путь, который проходит активированный В-лимфоцит в процессе своего созревания до секретирующей иммуноглобулин плазматической клетки, имеет несколько этапов, представленных разными популяциями В-клеток, среди которых – предплазмабласты, плазмабласты и плазматические клетки с разной степенью зрелости. Все процессы, происходящие в активированных В-лимфоцитах и готовящие их к активному синтезу и секреции иммуноглобулинов, находятся под контролем множества факторов, часть из которых не известна к настоящему дню, и их изучение является одним из основных направлений современной иммунологии.

Белок В-лимфоцитов FCRLA – член нового семейства FcR-like (FCRL). Белки этого семейства входят в суперсемейство иммуноглобулинов и структурно гомологичны классическим Fc-рецепторам. FCRLA – необычный представитель семейства FCRL. В отличие от остальных членов семейства FCRL и классических FcR – типичных поверхностных рецепторов, FCRLA не имеет трансмембранного участка и экспрессируется внутриклеточно, являясь резидентным белком ЭПР. Установлено, что уровень его экспрессии зависит от стадии развития В-клетки – наивные В-лимфоциты характеризуются низким количеством FCRLA, которое увеличивается по мере их активации, достигая своего максимума у высоко активированных В-клеток. Вместе с тем, плазматические клетки человека и мыши практически не содержат FCRLA. Показано, что FCRLA челове-

* Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-01809 и 14-04-32364.

ка связывает иммуноглобулины изотипов IgG, IgA, IgM. На основании всех этих данных была сформулирована гипотеза о том, что FCRLA принимает участие в регуляции дифференцировки В-клеток. Предположительно, данный белок блокирует секрецию иммуноглобулина на терминальных стадиях созревания В-лимфоцитов, предшествующих образованию плазматической клетки.

Данная гипотеза была проверена в эксперименте по конститутивной экспрессии FCRLA в первичной культуре наивных В-лимфоцитов мыши, с последующей активацией LPS. Для этого использовали лентивирусную конструкцию, экспрессирующую mFCRLA с конститутивного промотора EF1-alfa совместно с флюоресцентным белком GFP. Исследовали влияние конститутивной экспрессии FCRLA на ряд параметров развития В-клеток: уровень внутриклеточного и секретируемого IgM, уровень экспрессии BiP, EDEM, XBP1s, Blimp. Обнаруженное увеличение количества бластных форм В-клеток в случае конститутивной экспрессии mFCRLA указывают на его значение для дифференцировки наивной В-клетки в активированную и далее в плазматическую. Вместе с тем, установлено достоверное уменьшение содержания секретируемого клетками IgM в ряду неинфицированная культура – культура, зараженная вирусом pWPI-empty – культура, зараженная вирусом pWPI mFCRLA, что свидетельствует о негативном влиянии FCRLA на процесс секреции иммуноглобулина в активированной В-клетке.

М. Н. Львова¹, **Т. Г. Дужак**², **М. В. Жукова**¹, **Е. В. Киселева**¹
А. В. Катохин¹, **В. А. Мордвинов**¹

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН*

² *Институт «Международный томографический центр» СО РАН*

АНАЛИЗ СОДЕРЖИМОГО КИШЕЧНИКА И СЕКРЕТОРНОГО ПРОДУКТА ПЕЧЕНОЧНОГО СОСАЛЬЩИКА *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Описторхоз – гельминтоз, вызываемый паразитическими плоскими червями рода *Opisthorchis* – *O. felineus* и *O. viverrini*. У человека описторхоз отличается длительным течением и развитием тяжелых осложнений, таких как холангит, холецистит, стриктуры желчевыводящих путей, абсцессы печени, панкреатит и другие, а также, по данным ряда авторов, может способствовать возникновению холангиокарциномы. С одной стороны на территории Российской Федерации находится самый крупный в мире очаг описторхоза вызванного *O. felineus* – Обь-Иртышский бассейн, с другой с увеличением потока туристов в Юго-Восточную Азию стали неред-

кими случаи завозного описторхоза, возбудителем которого является *O. viverrini*.

При сравнительных гистологических и иммуногистохимических исследованиях патоморфологических изменений в печени лабораторных животных (*Mesocricetus auratus*) выявлена более выраженная интенсивность воспаления, фиброза, гиперплазии эпителия желчных протоков и бокаловидных клеток, дисплазии, и более раннее их появление при описторхозе, вызванном *O. felineus*, по сравнению с животными инфицированными *O. viverrini*. Так как значительный вклад в возникновение и развитие патологических изменений в гепатобилиарной системе окончательных хозяев при описторхозе вносят вещества, секретируемые паразитами, так называемый экскреторно-секреторный продукт – ЭСП. И в литературе описан белковый состав ЭСП *O. viverrini* (Mulvenna et al., 2010). Был проанализирован белковый состав 24 часовой фракции ЭСП *O. felineus*, полученной в условиях культивирования *in vitro*, с помощью протеомного подхода высокой точности и разрешения – метод масс-спектрометрии с использованием масс-анализатора ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием. Определено 37 белков – компонентов ЭСП *O. felineus*, относящихся к следующим группам: антиоксидантные (Cu/Zn супероксиддисмутаза, 4 изоформы глутатион-S-трансфераз, тиоредоксин пероксидаза, тиоредоксин), белки цитоскелета (бета-тубулин, парамиозин), метаболические ферменты (уроканат гидратаза, глутаматдегидрогеназа, ретинолдегидрогеназа, фруктозо-1,6-бисфосфатаза, фосфоенолпируваткарбоксилаза, фруктозо 1,6-бисфосфат альдолаза, енолаза, лактатдегидрогеназа, триозофосфатизомераза), транспортные белки (миоглобин, ферритин, белок, связывающий жирные кислоты), протеолитические ферменты (катепсины F и B1, цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2), ингибиторы протеаз, белки с неизвестной функцией и другие.

В ЭСП *O. felineus* с помощью электронной микроскопии обнаружены экзосомоподобные микровезикулы (80-200 нм), с помощью которых предположительно секретируются белки, не имеющие сигнального пептида (не секреторные).

По предварительным данным спектр протеаз в ЭСП у представителей рода *Opisthorchis* заметно различается. У *O. viverrini* обнаружен только катепсин D в минимальном количестве, что позволило авторам исследования (Mulvenna et al., 2010) предположить, что протеазы не являются основным компонентом ЭСП этого паразита в отличие от других трематод, в том числе и *O. felineus*, у которого определено как минимум 4 протеазы (катепсины F и B1, цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2). Более сложный состав протеаз в ЭСП *O. felineus* по сравнению с таковым у *O. viverrini* может быть одной из причин более выраженной патогенности *O. felineus* при сравнительном исследовании патологических проявлений в печени на модели лабораторных животных при описторхозах, вызванных

этими гельминтами (Lvova et al 2012). В этом же исследовании отмечено, что на срезах, в которые попадает кишечник паразитов, содержимое в течение всего эксперимента у 2 видов *O. felineus* и *O. viverrini* отличалось (при световой микроскопии). В просвете кишечника *O. felineus* были темно-коричневые, черные гранулы, которых не наблюдалось в кишечнике у *O. viverrini*. С помощью электронной микроскопии в просвете кишечника *O. felineus* наряду с черным электроноплотным аморфной формы слоистыми гранулами обнаружены клетки крови (в том числе и эритроциты). Предварительное электронно-микроскопическое исследование кишечника *O. viverrini* показало, что его содержимое неоднородное, но таких кристаллов как у *O. felineus* нам найти не удалось. Электронная сканирующая микроскопия выделенных из кишечника гранул показала их слоистую кристаллическую структуру. С помощью спектроскопии потерь энергии электронов в составе этих гранул обнаружено присутствие железа, а масс спектрометрии – присутствие в них же гема.

Таким образом, в кишечнике *O. felineus* обнаружен пигмент – гемозоин. Это продукт полимеризации гема в свою очередь являющийся широко распространенным способом детоксификации последнего у паразитов различных видов, в том числе и трематод, питающихся кровью хозяина.

Список литературы

Lvova M. N. et al. 2012. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. *Parasitology International*, 61 (1): 167–172.

Mulvenna J et al. 2010. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics*, 10 (5): 1063–1078.

В. Ю. Овчинников¹, Д. А. Афонников¹, Г. В. Васильев¹
Е. В. Кашина¹, В. Sripa², В. А. Мордвинов¹, А. В. Катохин¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН

² KhonKaenUniversity, Thailand

ИДЕНТИФИКАЦИЯ микроРНК ГЕНОВ ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ СЕМЕЙСТВА OPISTHORCHIIDAE

Opisthorchis felineus, *O. Viverrini* и *Clonorchissinensis* (класс Trematoda, отряд Plagiorchiida, семейство Opisthorchiidae) – паразитические плоские черви с сложным жизненным циклом. Эти трематоды вызывают заболевания гепатобилиарной системы известные как описторхоз/клонорхоз. Данные заболевания характеризуются длительным течением и тяжелыми последствиями, одними из которых являются онкологические заболевания желчных путей и печени. Последние исследования плоских червей в основном были сфокусированы на биологии развития и молекулярных механизмах патологических воздействий на организм хозяина. Например, белок кодирующие транскрипты были хорошо описаны для трех представителей семейства Opisthorchiidae. Однако транскриптом, содержащий миРНК, не был хорошо описан для описторхид.

МикроРНК (миРНК) – это малые РНК, которые подавляют экспрессию мРНК на посттранскрипционном уровне и играют важную роль в развитии и жизненно важных функциях. Данное исследование является первым сравнительным анализом миРНК *O. felineus*, *O. viverrini*, и *C. Sinensis* и описанием геномной организации генов миРНК у представителей семейства Opisthorchiidae.

С помощью секвенирования по технологии SOLiD 18 консервативных и 43 новых миРНК было определено для *O. felineus*, 16 консервативных и 20 новых миРНК – для *O. viverrini*, и 18 консервативных и 33 новых миРНК – для *C. sinensis*. Стоит отметить, что почти все новые миРНК являются видоспецифичными. Поиск пре-миРНК в доступных геномах трематод позволил определить миРНК гены. Анализ геномной организации миРНК выявил два миРНК кластера, один участок похожий на кластер и одну интронную миРНК. Присутствие двух кластеров было экспериментально подтверждено во всех трех паразитах.

Д. С. Пирожкова, М. А. Цыганов

Институт цитологии и генетики СО РАН

**Р-ГЛИКОПРОТЕИНЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS*:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ
И СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ЭКСПРЕССИИ**

Введение. Возбудитель описторхоза *Opisthorchis felineus* – плоский червь класса Trematoda, паразит печени млекопитающих (в т.ч. человека), распространённый на территории стран СНГ. Жизнедеятельность этого паразита вызывает ряд серьёзных патологий, в их числе холангиты, холецистит, фиброз. Эти заболевания вызываются в том числе продуктами секреции червя. Основными белками клеточной секреторно-экскреторной системы являются белки АТФ-зависимого мембранного транспорта (АВС-белки), которые были обнаружены во всех таксонах от прокариот до человека. Белки ABCB1 подсемейства, также называемые Р-гликопротеинами или MDR (MultiDrugResistance), транспортируют метаболиты, полипептиды и ксенобиотики из клетки наружу, используя энергию АТФ, и связаны с возникновением феномена лекарственной устойчивости у опухолей и паразитов, в том числе гельминтов. АВС-транспортеры *O. felineus* ранее не были исследованы.

Цель работы: исследование молекулярных механизмов функционирования клеточной секреторно-экскреторной системы червя для поиска молекулярных мишеней для новых противопаразитарных препаратов. Для её достижения были поставлены задачи по идентификации генов ABCB1-белков, установлению структуры и доменной организации ABCB1-белков, подтверждению функциональной активности, а также оценке уровня экспрессии генов.

Материалы и методы. Инструменты NCBI(Blast, ORFfinder, CD-search), программное обеспечение MEGA6, секвенирование методом Сэнгера, 3'-RACE-ПЦР, ПЦР в реальном времени, цифровая капельная ПЦР (ddPCR), система оптического секционирования Apotome, микроскоп AxioImagerZ1 (ZEISS).

Результаты. Анализ результатов первичной сборки генома и транскриптома червя с помощью инструментов NCBI показал наличие у *O. felineus* 4 белков подгруппы ABCB1, получивших названия PgP1-4 (от PgP-Р-гликопротеин). Три из них были гомологичны (>90%) соответствующим белкам *C. sinensis*, а один (PgP4) не имел подобных гомологов. Для генов PgP1-3 кодирующие последовательности были реконструированы из библиотеки коротких прочтений, кДНК гена PgP4 была полностью секвенирована (GenBank: KJ830771). Была установлена экзон-интронная структура

всех четырех генов и проведён филогенетический анализ белков ABCB1, который подтвердил уникальность PgP4.

Исследованы уровни экспрессии мРНКPgP1-4 на различных стадиях жизненного цикла червя, а также их изменение в ответ на обработку празиквантелом, альбендазолом, карбендацимом, гемоглобином и ТХДД (тетрахлородибензодиоксин) с помощью ddPCR. Было показано, что PgP4 преобладает во взрослых паразитах (по сравнению с другими PgP), однако слабо экспрессируется в ювенильных. Кроме того, при переходе от ювенильной стадии к взрослой значительно возрастает экспрессия PgP1. Экспрессия PgP4 в ювенильных червях значительно возрастает при добавлении гемоглобина в среду инкубации. Для подтверждения функциональной активности ABCB1-белков взрослых паразитов инкубировали в среде с добавлением резорфина, который является их специфическим субстратом. Было показано, что резорфин накапливается в каналах выделительной системы, что свидетельствует о функциональной активности Р-гликопротеинов и их значимости в выделении ксенобиотиков.

Заключение. У *O. felineus* было обнаружено четыре Р-гликопротеина. PgP4 является видоспецифическим, наиболее экспрессируемым у взрослого червя и, вероятно, наиболее важным белком ABCB1-подсемейства, и может послужить молекулярной мишенью для создания новых фармакологических препаратов.

М. Ю. Помазной¹, М. Д. Логачева²
А. В. Катохин¹, В. А. Мордвинов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА *OPISTHORCHIS FELINEUS* МЕТОДОМ RNA-SEQ

Паразитоз, вызываемый представителем семейства Описторхид *Opisthorchis felineus* является тяжелым заболеванием гепатобилиарной системы, способным привести к злокачественной трансформации клеток желчных протоков. Обладая высокой медицинской значимостью, особенно для сибирского региона, этот вид до сих пор мало изучен с позиции молекулярной биологии. В частности, полнотранскриптомные данные могли бы стать важнейшим источником для поиска новых мишеней в разработке антигельминтных препаратов. В связи с этим мы применили технологию секвенирования нового поколения и получили и проанализировали около 150 млн прочтений, полученных на платформе IlluminaHiSeq 2000. Имею-

щиеся данные после обработки образуют 12 526 уникальных генов, представленных в GenBank под номером GBJA00000000.

Анализ этого транскриптома показал ряд особенностей генной организации *O. felineus*, связанных с его образом жизни. Данный паразит существует в специфических условиях желчевыводящих путей хозяина, характеризующихся наличием многих питательных веществ в готовом виде с одной стороны и отсутствием достаточных количеств свободного кислорода с другой. Нами обнаружена редукция системы синтеза полиаминов, а также тесно связанного с ней цикла синтеза метионина. Мы считаем, что это является следствием использования полиаминов хозяина, а также недостатка кислорода, необходимого для осуществления всех реакций этого биохимического пути. Другой любопытной обнаруженной особенностью является редукция белков, ответственных за сборку пероксисом – клеточных органелл, у большинства организмов осуществляющих процессы метаболизма жирных кислот. Последние, как известно, находятся в большом количестве в желчных путях человека и, возможно, являются важным источником энергии для *O. felineus*. Потенциальное отсутствие пероксисом указывает на особенности метаболизма жирных кислот, как возможное приспособление к гипоксии. Кроме того, среди наиболее экспрессируемых белков обнаружены недавно изученные на родственной трематоды *F. hepatica* HDM белки, являющиеся ярким примером молекулярной мимикрии паразита под гуморальные эффекторные молекулы организма-носителя, а также миоглобин, ответственных за запасание кислорода.

Полученные полнотранскриптомные данные дают важную информацию о приспособлениях *O. felineus* к паразитическому образу жизни, а также образуют необходимый фундамент для последующих молекулярно-биологических исследований, направленных на искоренение описторхоза.

А. М. Савченко¹, А. Ю. Бакулина², О. И. Голосова¹

¹ ООО НЦИТ «Унипро»

² Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»

РЕШЕНИЕ ЗАДАЧ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ С ПОМОЩЬЮ UNIPRO UGENE

В современной молекулярной биологии широко используются методы биоинформатики, как на этапе планирования эксперимента, так и для обработки результатов. Экспоненциально растет объем баз геномных и протеомных данных, в частности, в текущей версии GenBank от 15 июня 2014 года содержится 173 миллионов нуклеотидных последовательностей [1].

Компьютер уже давно стал полноправным инструментом молекулярного биолога, и существует множество приложений и веб-сайтов для обработки биологической информации.

Unipro UGENE [2] является интегрированной платформой для решения разнообразных биологических задач, включая самые распространенные. Наиболее востребованные и популярные алгоритмы объединены в едином графическом интерфейсе. Также в UGENE реализованы некоторые уникальные алгоритмы, недоступные в других источниках. С помощью UGENE можно сделать парное или множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, транслировать нуклеотидные последовательности, подобрать праймеры, построить филогенетические деревья, провести поиск гомологов, открытых рамок считывания, сайтов рестрикции и так далее. Задачи такого рода регулярно встают в любой молекулярно-биологической лаборатории. Пользователю UGENE не потребуется искать, устанавливать и осваивать разнородные программы, а также решать вопросы передачи данных между ними.

Для поиска гомологов в UGENE реализованы алгоритмы BLAST и HMMER. Для найденных последовательностей можно сразу же сделать множественное выравнивание с помощью одного из встроенных алгоритмов: ClustalW, ClustalO, MUSCLE, Kalign, MAFFT, T-Coffee. Редактор множественных выравниваний имеет широкий набор функций, которые позволяют наглядно выделить сходства и различия между последовательностями. Имеющиеся в UGENE алгоритмы построения филогенетических деревьев (PhyML Maximum Likelihood, PHYLIP Neighbour Joining, MrBayes) в совокупности с редактором филогенетических деревьев предоставляют широкие возможности по исследованию эволюционных взаимосвязей генов. После построения дерева можно отобразить в отдельном окне или же воспользоваться режимом синхронизации между деревом и выравниванием. Редактор филогенетических деревьев позволяет выполнять следующие функции: смена корня у дерева, изменение положений веток, отображение дерева в укорененном, кольцевом или неукорененном виде.

Благодаря богатым возможностям настройки отображения данных, таких как разметка плазмиды, дерева, выравнивания, UGENE удобно использовать для подготовки иллюстраций. Изображения могут быть экспортированы в различные растровые форматы (JPEG, TIFF, BMP и др.), в формат PDF или в векторный формат SVG. В зависимости от выбранного формата и типа экспортируемого объекта могут быть также доступны дополнительные настройки экспорта.

Также программа UGENE содержит инструменты для работы с результатами секвенирования по Сэнгеру и NGS: контроль качества и предварительная фильтрация, сборка генома, гибко настраиваемая функциональная аннотация.

UGENE предоставляет возможность автоматического анализа молекулярно-биологических и генетических данных. С помощью дизайнера вычислительных схем [3] каждый пользователь может автоматизировать рутинную работу, используя уже готовые или создавая собственные комплексные схемы для обработки данных. Эти схемы можно легко переиспользовать, изменяя данные или параметры алгоритмов, сохранять, обмениваться ими с коллегами.

Программа UGENE распространяется бесплатно, работает на компьютерах под управлением Windows, Mac OS X и Linux. Возможности программы постоянно расширяются. Разработчики программы готовы прислушиваться к пользователям и вносить необходимые дополнения и изменения.

GenBank release notes: <ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/gbrel.txt>

Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit» Konstantin Okonechnikov; Olga Golosova; Mikhail Fursov; the UGENE team
Bioinformatics 2012; doi:10.1093/bioinformatics/bts091

Workflow Designer manual:

http://ugene.unipro.ru/downloads/WorkflowDesigner_UserManual.pdf

В. А. Петренко^{1,2}, А. В. Тронин¹, Т. А. Середина¹

¹ ЗАО «Медико-биологический Союз», Новосибирск

² Институт цитологии и генетики СО РАН

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ОПИСТОРХОЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Описторхоз – это широко распространенное паразитарное инвазионное заболевание человека, возбудителем которого являются гельминты. Заражение человека печеночными трематодами происходит при употреблении в пищу сырой, малосоленой и недостаточно термически обработанной рыбы, содержащей метацеркарии паразита.

Существующая диагностика паразитических заболеваний основана на микроскопическом исследовании образцов кала человека на наличие яиц паразитов. Но такой паразитологический метод диагностики имеет много недостатков и недостаточно чувствителен для адекватной диагностики этих заболеваний.

В данной работе была разработана методика дифференциальной диагностики паразитарных заболеваний, основанная на выделении нуклеиновых кислот из образцов кала человека и проведении реакции амплифика-

ции выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. В качестве мишеней были выбраны фрагменты ДНК четырех печеночных трематод *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* и *Metorchis bilis*.

Диагностическая чувствительность метода составила 91%, специфичность – 84%, по сравнению с копроовоскопией. Стоит отметить, что чувствительность копроовоскопии недостаточна и составляет около 60 %, в связи с чем некоторые из образцов определенных копроовоскопией могли оказаться ложноположительными или ложноотрицательными, особенно в малоинфицированных случаях. В итоге это могло привести к сдвигу статистических показателей нашей методики в меньшую сторону.

Чувствительность и специфичность метода полимеразной цепной реакции существенно выше по сравнению с другими технологиями. Помимо этого, примечательность данной методики заключается в том, что она позволяет не только детектировать наличие паразитарного заболевания, но и дифференцировать его от остальных гельминтозов. Также использование ПЦР диагностики в сравнении с иммунологическими методиками позволяет отслеживать динамику заболевания и детектировать наличие заболевания у прошедших лечение больных.

**А. М. Сократян, К. О. Баранов, С. В. Гусельников, Н. А. Чикаев
О. Ю. Волкова, Л. В. Мечетина, А. В. Таранин**

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

ИДЕНТИФИКАЦИЯ SLAMF9-РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСА

Иммунорегуляторные рецепторы – это молекулы, находящиеся на поверхности клеточной мембраны иммунных клеток и отвечающие за регуляцию их ключевых функций. По своим сигнальным функциям все иммунорегуляторные рецепторы делятся на два основных класса: ингибирующие и активирующие. Ингибирующие рецепторы экспонируются на клеточной поверхности в виде мономеров и несут в цитоплазматических доменах тирозин-содержащие ингибирующие сигнальные мотивы – ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Активирующие рецепторы имеют тирозин-содержащие активирующие мотивы ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) – либо в своем цитоплазматическом домене, либо в цитоплазматической части сигнальной субъединицы, в комплексе с которой рецептор экспонируется на поверхности клетки. Кроме рецепторов, содержащих ITAM- и ITIM-мотивы, выделяют также рецепторы с тирозин-содержащими переключающими мотивами (ITSM), способными влиять на активацию сигнального каскада в иммуно-

логических клетках, так на его подавление. Одними из ITSM-содержащих рецепторов является группа молекул, входящих в семейство CD2. CD2 семейство относится к надсемейству иммуноглобулинов (*IgSF* – Immunoglobulin superfamily), которые дифференциально представлены на поверхности клеток гемопоэтического ряда. Наибольшая экспрессия CD2-семейства обнаруживается в NK-клетках, Т-, В-лимфоцитах и дендритных клетках. Характерной особенностью представителей семейства CD2 является способность принимать участие во внутриродственных взаимодействиях: гетерофильных (между двумя разными молекулами семейства) и гомофильных (между двумя одинаковыми молекулами семейства). В данном семействе выявляется подсемейство SLAM (сигнальная лимфоцитарная активирующая молекула), состоящее из девяти членов, которое характеризуется важной особенностью: иммунорегуляторные рецепторы содержат в цитоплазматических доменах ITSM-подобные сигнальные мотивы, за исключением SLAMF2 (CD48), SLAMF8 и SLAMF9. Рецепторы SLAM-семейства принимают участие в регуляции клеточной цитотоксичности, гуморального и аутоиммунитета, жизнеспособности клеток, дифференцировки лимфоцитов и клеточной адгезии. Наименее изученным представителем SLAM-семейства является *SLAMF9* (*CD84-H1/SF2001*) функция которого и лиганд – неизвестны. Данные по экспрессии *SLAMF9* у разных групп исследователей противоречивые. Наличие у *SLAMF9* в мембран-проксимальной части неспаренного аминокислотного остатка Cys235, а также в трансмембрано-проксимальной части положительно заряженного аминокислотного остатка (Lys239), указывает на возможность взаимодействовать с другими трансмембранными белками (сигнальными субъединицами). Целью данной работы являлась идентификация *SLAMF9*-рецепторного комплекса. Ранее, в лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН был проведен анализ лимфоидных тканей, а также клеточных линий различного происхождения, который не позволил детектировать экспрессию *SLAMF9* на уровне белка *in vivo*, вследствие этого был сделан вывод, что экспрессия *SLAMF9* связана с определенным состоянием клетки. Поэтому для изучения функциональных свойств необходимо было эктопически экспрессировать *SLAMF9* в клеточной линии, в которых бы экспрессировались остальные компоненты рецепторного комплекса. В ходе данного исследования были получены рекомбинантные конструкции, позволяющие эктопически экспрессировать химерный белок, содержащий полноразмерный *SLAMF9*, слитый с тэгами (сMyc-6xHis или 2xStrep-Flag). Лентивирусами, на основе данных конструкций были трансдуцированы миелоидные и лимфоидные клеточные линии (Jurkat, MOLT4, BJAB, U937, THP-1, MAC6). Процент эффективности трансдукции, определенной по экспрессии репортерного белка сорGFP с использованием проточного цитофлуометра во всех клеточных линиях оказался на уровне 90-100%. Затем был проведен иммуноцитохимический анализ для определе-

ния уровня экспрессии химерного белка SLAMF9 при помощи моноклональных антител (E11) к варибельному домену SLAMF9. При помощи вестерн-блот анализа клеточных линий с высоким уровнем SLAMF9 было выявлено, что данный белок в Т-клеточных (THP-1) и В-клеточных (BJAB) линиях присутствует в мономерной форме (37 кДа) и некоторая часть в комплексе с молекулярной массой 70 кДа. В контрольной HEK293T клеточной линии SLAMF9 имеет подвижность на уровне 37 кДа и 75 кДа, что подразумевает присутствие белка в виде мономерной и димерной форм. Данные результаты говорят о том, что, вероятно, SLAMF9 взаимодействует с белком-лигандом, присутствующим и в Т-клетках, и в В-клетках. Дальнейшие исследования направлены на выделение SLAMF9-рецепторного комплекса и определение белка-лиганда. Данные результаты важны для определения возможной функции малоизученного белка SLAMF9. Так как иммунная система содержит помимо основных путей осуществления защитных функций и запасные, включающиеся при подавлении первых, изучение каждой молекулы иммунной системы, в том числе и SLAMF9, играет важнейшую роль в понимании механизмов ее работы.

**Г. А. Степанов, Д. В. Семенов, Ю. А. Филиппова, А. А. Нуштаева
Е. В. Кулигина, О. А. Коваль, В. А. Рихтер**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

НАПРАВЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК *

Разработка новых искусственных регуляторов экспрессии генов на основе знаний о структуре и функциях малых некодирующих РНК (нкРНК) является актуальной задачей для фундаментальной науки и практической медицины. В настоящее время известно, что малые нкРНК выполняют в клетках разнообразные функции – они участвуют в регуляции пост-транскрипционного созревания и стабильности различных РНК, могут влиять на транскрипцию и трансляцию мРНК, а также являются компонентами сложных рибонуклеопротеидных комплексов, в составе которых проявляют специфическую каталитическую активность.

К классу нкРНК относятся малые ядрышковые РНК (мяоРНК, от англ. snoRNAs), которые содержат в своей структуре так называемые С- и D-боксы (С/D-бокс-РНК) или Н- и АСА-боксы (Н/АСА-бокс-РНК). Эти РНК

* Работа поддержана грантами РФФИ № 14-04-31468 и 13-04-01058.

играют ключевую роль в пост-транскрипционной модификации нуклеотидов рРНК клеток эукариот, а также некоторых малых ядерных РНК.

В данной работе создан набор аналогов малых ядрышковых С/D-боксов РНК, направленных на модификацию заранее заданных нуклеотидов разных видов РНК, и с помощью трансфекции клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 этими аналогами выявлены характеристические особенности влияния С/D-бокс-РНК на экспрессию генов.

Аналоги С/D-бокс-РНК первой серии были направлены на нуклеотиды пре-мРНК и зрелой мРНК гена *HSPA8*, кодирующей белок теплового шока hsc70. Установлено, что под действием таких РНК, направленных на нуклеотиды, критичные для сплайсинга второго интрона пре-мРНК гена *HSPA8*, происходит снижение уровня мРНК гена-мишени в клетках MCF-7, сопровождаемое частичным нарушением сплайсинга пре-мРНК. Нарушения в ядерном созревании РНК-мишени проявлялись в увеличении содержания в клетках форм мРНК без одного или двух экзонов. Синтетические С/D-бокс-РНК второй серии были направлены на нуклеотиды рРНК, формирующие ключевые функциональные центры рибосом. Показано, что трансфекция клеток такими С/D-бокс-РНК приводит к увеличению глубины природного 2'-О-метилирования нуклеотидов рРНК, не вызывая *de novo* 2'-О-метилирования нуклеотидов-мишеней.

Установлено также, что трансфекция аналогов С/D-бокс-РНК в клетки MCF-7 снижает жизнеспособность клеток аденокарциномы в культуре, при этом комбинация аналогов С/D-бокс-РНК с тамоксифеном, циклогексимидом или интерфероном α оказывает синергетический эффект.

Для детального изучения механизмов влияния С/D-бокс-РНК на экспрессию генов в клетках человека был проведен полнотранскриптомный анализ изменения уровня экспрессии генов в клетках MCF-7 под действием созданных аналогов малых ядрышковых С/D-бокс-РНК. Установлено, что в клетках, трансфицированных этими аналогами, происходит повышение уровня транскрипции группы генов интерферонового ответа и генов апоптотического каскада. Изменение уровня экспрессии именно интерферон-чувствительных генов может обуславливать цитотоксическое действие аналогов С/D-бокс-РНК.

По результатам полнотранскриптомного анализа экспрессии генов на микрочипах для каждого из аналогов С/D-бокс-РНК были выявлены мРНК, уровень которых снизился в трансфицированных клетках MCF-7. Функциональный анализ группы генов с пониженной экспрессией не выявил общих биохимических процессов, влияющих на уровень РНК этих генов. В то же время биоинформационный анализ данных позволил предположить, что наблюдаемое понижение уровня большинства транскриптов в клетках MCF-7 происходит за счет активации специфичного набора микроРНК, направленных на подавление экспрессии большой группы генов.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована возможность регулировать экспрессию генов в клетках человека с помощью синтетических аналогов малых ядрышковых РНК. Полученные результаты позволили заключить, что аналоги С/D-бокс-РНК способны влиять на процессинг разных видов РНК-мишеней и выступать в качестве индукторов интерферонового ответа клеток человека. Результаты настоящей работы закладывают основу для разработки искусственных модуляторов экспрессии генов в клетках человека на основе знаний о структурных особенностях и функциях малых ядрышковых РНК.

Н. С. Фаттахов¹, **М. А. Василенко**¹, **Д. И. Куликов**¹
Д. А. Скуратовская¹, **Е. В. Кириенкова**¹, **П. А. Затолокин**²
Л. С. Литвинова¹

¹ *Балтийский федеральный университет им. И. Канта*

² *Областная клиническая больница Калининградской области*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ПОЛИМОРФИЗМА С774Т ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Метаболический синдром (МС) представляет собой комплекс симптомов, который включает в себя так называемый «смертельный квартет»: инсулинорезистентность и нарушение толерантности к глюкозе, ожирение, высокое артериальное давление и дислипидемию. В настоящее время активно ведется поиск значимых генотипов и аллелей, обладающих негативными или протективными эффектами в отношении компонентов МС. Ранним предиктором атеросклеротических нарушений, развивающихся при МС, служит эндотелиальная дисфункция. Ее важными маркерами являются сывороточные уровни оксида азота (NO) и эндотелина-1 [2]. При «нормальной» функции эндотелия баланс смещен в сторону поддержания вазодилатации, которая, в определенной степени, обеспечивается активностью фермента – эндотелиальной NO-синтазы (eNOS).

eNOS участвует в синтезе NO и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления. Дифференциальная активность выработки NO связана с полиморфизмом гена eNOS, в котором, на сегодняшний день, выявлен полиморфизм в 11 местах (8 из них изучали в качестве фактора риска развития сердечно-сосудистой патологии). В основном, данные были получены на когорте больных с патологией системы кровообращения. При этом подавляющая часть исследований направлена на оценку распространенности полиморфизмов в гене eNOS в разных попу-

ляциях человека без выявления ассоциативных связей с какой-либо патологией.

В связи с этим, целью нашей работы явилось выявление ассоциации полиморфизма C774T (rs1549758) гена эндотелиальной NO-синтазы с риском развития МС и установление связи данного полиморфизма с маркерами эндотелиальной дисфункции.

Объектом исследования явилась рандомизированная выборка пациентов с МС из европеоидной популяции Калининградской области. Контрольную группу составили 48 здоровых доноров, сопоставимых с группой больных по гендерным и возрастным признакам. Основные клинические и биохимические характеристики изучаемых выборок представлены в таблице 1. Диагноз метаболического синдрома устанавливали согласно критериям Международной федерации диабета [3], распространенность сахарного диабета 2 типа в исследуемой группе составила 11%, артериальной гипертензии – 24%.

Выделение геномной ДНК из периферической венозной крови проводили с использованием коммерческих наборов «ДНК-Экстран-1» согласно протоколу производителя («Синтол», Россия). Исследование генотипов осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010, Statistica 8.0. Уровни нитритов, которые являются косвенными маркерами концентрации оксида азота, определяли в сыворотке колориметрическим методом, основанном на реакции Грисса [1]. Уровень эндотелина-1 определяли количественным иммуноферментным методом в сыворотке крови с помощью набора «Endothelin 1-21» («Biomédica», Австрия). Количество eNOS в сыворотке оценивали методом ELISA с помощью набора фирмы «Cloud-Clone Corp.» (США).

Таблица 1

Клинические и биохимические характеристики исследуемых групп
(Mean $\pm$ SD)

Показатели	Пациенты с метаболическим синдромом (n = 64)	Здоровые доноры (n = 48)
Мужчины/женщины	23/41	20/28
Возраст, лет	44,1 $\pm$ 7,9	36,9 $\pm$ 7,2
ИМТ, кг/м ²	37,2 $\pm$ 4	22,9 $\pm$ 2
Отношение объем талии/объем бедер	0,9 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,08
Систолическое давление, мм рт.ст.	130,1 $\pm$ 15,8	110,9 $\pm$ 10,8
Диастолическое дав-	78,5 $\pm$ 12,1	75,2 $\pm$ 12,4

ление, мм рт. ст.		
Общий холестерин, ммоль/л	6,1±1,2	4,7±0,4
Триглицериды, ммоль/л	2,1±0,5	0,9±0,4
ЛПВП, ммоль/л	1,2±0,2	1,5±0,4
ЛПНП, ммоль/л	3,8±0,6	2,7±0,4
Глюкоза, ммоль/л	6,8±1,2	5,1±0,4

Примечание: Mean – среднее значение, SD – стандартное отклонение.

Статистический анализ распределения частот генотипов полиморфизма C774T гена eNOS показал, что среди пациентов с MC достоверно реже встречались гомозиготы по аллелю С, наиболее частым генотипом оказался гомозиготный вариант по аллелю Т. Среди здоровых доноров наиболее частым оказался генотип СС. Было также замечено, что частота гомозиготного генотипа ТТ у больных MC была значимо выше, чем в группе здоровых доноров, а гомозигот по аллелю С – напротив, ниже ($\chi^2=6,87$; $p=0,03$).

Показана положительная ассоциация MC с аллелем Т (OR=2,27) и генотипами СТ (OR=2,14) и ТТ (OR=2,82) полиморфизма C774T гена eNOS. В то же время аллель С (OR=0,44) и гомозиготный СС генотип (OR=0,36) обладали протективным эффектом в отношении MC.

Не было выявлено различий в сыровоточных уровнях нитритов у больных MC (3,8 (3,23;4,98) мкмоль/л) по сравнению со здоровыми донорами (3,26 (3,02;3,62) мкмоль/л) ($p=0,12$). У больных MC содержание эндотелина-1 в сыровотке (0,42 (0,24;1,49) фмоль/мл) было достоверно выше, чем у здоровых доноров (0,24 (0,2;0,32) фмоль/мл) ($p=0,048$). Уровень eNOS в сыровотке у больных MC (1418,44 (1113,48;1957,45) пг/мл) был также достоверно выше, чем у здоровых доноров (865,25 (670,21;898,94) пг/мл) ($p=0,0002$).

Показано, что пациенты с генотипом ТТ имеют достоверно более высокий уровень эндотелина-1 в сыровотке по сравнению с больными MC, имеющими генотип С/Т ($p=0,03$) (табл. 2). Других достоверных различий в содержании исследуемых сыровоточных показателей у больных с разными генотипами выявлено не было.

Таблица 2

Уровни нитритов, eNOS и эндотелина-1 в сыровотке больных метаболическим синдромом в зависимости от генотипа (Me (Q1;Q3))

Показатель	Генотип С/С n=27	Генотип С/Т n=30	Генотип Т/Т n=7
Нитриты,	3,69 (3,25;4,93)	3,85 (3,2;4,92)	4,02 (3,43;4,58)

мкмоль/л			
eNOS, пг/мл	1712,77 (1113,48;1964,54)	1425,53 (1202,13;1957,45)	1331,56 (1095,74;1386,52)
Эндотелин-1, фмоль/мл	0,48 (0,22;1,49)	0,34 (0,24;1,02)	2,73 (0,68;4,9)*

Примечание: * $p < 0,05$ – достоверность различий показателей между пациентами с генотипами Т/Т и С/Т.

Таким образом, вероятно, полиморфизм С774Т гена eNOS влияет на продукцию самого сильного эндогенного вазоконстриктора – эндотелина-1. В частности, определяющую роль в повышении его продукции играет гомозиготный генотип по редкому аллелю Т/Т, ассоциированный с риском развития МС в российской популяции. Неизмененный уровень нитритов в сыворотке больных по сравнению с таковым у здоровых доноров, свидетельствует о нормальной продукции оксида азота (преимущественно эндотелием) при МС и, следовательно, об отсутствии выраженной эндотелиальной дисфункции. Кроме того, нормальное количество оксида азота в сыворотке крови при повышенном содержании eNOS, может свидетельствовать о вероятном преобладании данного фермента у больных МС в неактивной (разобщенной) форме. Возможные причины и механизмы повышения eNOS в сыворотке пациентов с МС требуют дальнейшего детального изучения.

Список литературы

1. Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. Lancet. 2005; 366: 1059–1062.
2. Ford E.S., Giles W.H., Mokdad A.H. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. Diabetes Care. 2004; 27(10):2444–2449.
3. Moshage H., Kok B., Huizenga J.R., Jansen P.L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. Clin Chem. 1995; 41(6 Pt 1):892-6.

Ю. А. Филиппова^{1,2}, Г. А. Степанов¹, Д. В. Семенов¹
А. В. Савельева¹, О. А. Коваль^{1,2}, И. В. Рабинов¹
Е. В. Кулигина¹, В. А. Рихтер¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

² Новосибирский государственный университет

**ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ МАЛЫХ
НЕКОДИРУЮЩИХ РНК НА ТРАНСКРИПЦИЮ
И ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОЕ
СОЗРЕВАНИЕ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ***

Некодирующие РНК включают в себя множество классов разнообразных РНК, способных осуществлять регуляцию экспрессии генов путем взаимодействия с РНК-мишенью на различных этапах транскрипции и посттранскрипционного созревания. Структура некодирующих РНК может служить основой для конструирования синтетических регуляторных РНК.

Нами были сконструированы и получены аналоги малых ядрышковых С/D бокс РНК человека, направляющие 2'-О-метилирование различных нуклеотидов в составе 18S и 28S рРНК человека. Одним из наиболее распространенных методов выявления сайтов 2'-О-метилирования является метод терминации обратной транскрипции (ОТ), основанный на способности 2'-О-метильной группы вызывать остановку ревертазы. Нами была проведена адаптация данного метода к анализу продуктов терминации ОТ капиллярным гель-электрофорезом. Оптимизированный подход позволил не только достоверно определить положения 2'-О-метилованных нуклеотидов в 28S рРНК человека, но и провести количественный анализ глубины модификации отдельных сайтов 2'-О-метилования. Показано, что трансфекция клеток MCF-7 аналогами С/D бокс РНК приводит к увеличению глубины модификации природных сайтов 2'-О-метилования, не индуцируя *de novo* метилирования нуклеотидов.

Недавно был обнаружен новый класс некодирующих РНК, ассоциированных с промоторными областями генов в клетках эукариот. Количество таких РНК в клетках коррелирует с уровнем экспрессии соответствующих генов, что может указывать на их участие в регуляции транскрипции. В нашей работе были использованы клетки MCF-7, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (eGFP) под промотором цитомегаловируса человека (CMV-IE). Мы сконструировали и получили промотор-направленные синтетические РНК (пнРНК), комплементарные разным

* Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 13-04-01058 и 14-04-31468) и Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН № 84 (2012–2014 гг.).

участкам промотора CMV-IE. Изменение уровня мРНК и белка eGFP определяли методами количественного ОТ-ПЦР и проточной цитофлуориметрии, соответственно. Установлено, что трансфекция пмРНК в клетки MCF-7 приводит к увеличению уровня мРНК eGFP и уменьшению популяции флуоресцентных клеток.

Полученные данные показывают возможность применения синтетических конструкций на основе РНК для регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и посттранскрипционной модификации. Тем самым, набор современных средств для регуляции экспрессии генов, включающих микроРНК и siРНК, может быть расширен новыми классами регуляторных РНК, такими как C/D бокс РНК и паРНК.

Д. В. Шаньшин, К. А. Иванова, Д. Н. Щербаков

*Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*

КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВОГО ФАГМИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ДИСПЛЕЯ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ

Препараты на основе моноклональных антител успешно применяются для терапии вирусных, аутоиммунных и онкозаболеваний. Антитела – незаменимые реагенты для диагностики и обнаружения следовых количеств веществ. Использование гибридомной технологии для получения моноклональных антител имеет ряд недостатков, некоторые из которых можно преодолеть с помощью техники фагового дисплея.

Технология фагового дисплея, с использованием *invitro* аффинной селекции, позволяет находить последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей антител, которые распознают мишень с высокой точностью. Принципы фагового дисплея – это конструирование обширной библиотеки антител (на основе вирионов) и скрининг ее с целью поиска интересующего варианта. Библиотека создается путем клонирования генов переменных доменов тяжелой и легкой цепей антител в составе конструкции на основе плазмидного вектора. Определяющим для библиотеки является адекватная сборка переменных фрагментов антител на поверхности фаговых частиц, воспроизводящая природную структуру этих доменов в составе полноразмерного антитела. Для фаговых библиотек, у которых комплекс переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей антитела стабилизируется за счет межмолекулярного взаимодействия, важным является согласованный синтез димеризующихся мономеров комплекса. Обе эти задачи решаются с помощью включения в конструкцию вектора дополнительных регуляторных элементов.

В работе сконструирован фагмидный вектор для дисплея фрагментов антител человека. Для этого была рассчитана ДНК-кассета, кодирующая элементы для встройки и экспрессии переменных доменов антител. Из фагмиды были удалены сайты рестрикции, препятствующие клонированию целевых последовательностей ДНК. С использованием олигонуклеотид-направленного мутагенеза в вектор была встроена нуклеотидная последовательность с оптимальными стерическими характеристиками для клонирования ДНК-касеты.

В результате экспрессии полученной ДНК конструкции образуется единая полицистронная матрица под контролем лактозного промотора, присутствующего в исходной плазмиде. В ходе трансляции переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей образуется отдельный продукт с каждого рибосомсвязывающего сайта, что достигается наличием стоп-кодонов. Лидерная последовательность, связанная с переменным фрагментом тяжелой цепи адресует его белковый продукт в периплазматическое пространство клетки, изолируя от действия цитоплазматических протеаз, что повышает стабильность продукта, а также исключает преждевременную гетеродимеризацию белковых доменов и образование мини-антител до сборки фага. Аминокислотная лидерная последовательность, связанная с переменным фрагментом легкой цепи адресует его к мембране – месту сборки фаговых частиц.

В конструкции, включающей два отдельных белковых продукта под контролем одного промотора, может наблюдаться снижение экспрессии второго белкового продукта. Для усиления экспрессии переменного фрагмента легкой цепи, была рассчитана альтернативная конструкция ДНК-касеты. В конструкцию была добавлена нуклеотидная последовательность, соответствующая промотору *recA*, максимально отличающаяся от последовательности, кодирующей лактозный промотор, для избежания возможных рекомбинаций и делеций в нуклеотидной последовательности фагмиды. Также было увеличено количество нуклеотидов фланкирующих сайты рестрикции, предназначенные для встройки переменных фрагментов антител, что позволяет значительно снизить стерические препятствия для эндонуклеаз рестрикции.

В результате работы сконструировано два варианта фагмидного вектора, способных обеспечить создание библиотек мини-антител.

Д. В. Юдкин

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИЧИН ЛОМКОСТИ ХРОМОСОМ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ

Синдром ломкой X-хромосомы – самая распространенная причина наследственной умственной отсталости у человека. Его частота в популяции примерно 1/4000 – 1/6000. Причиной появления этого заболевания является экспансия триплетного повтора CGG в 5' промоторной области гена *FMRI*. В норме размер повтора не превышает 54 единиц. При размере повтора от 55 до 200 единиц формируется премутантный аллель и развиваются синдром атаксии/тремора или первичная недостаточность яичников. При размере повтора больше 200 триплетов развивается синдром ломкой X-хромосомы. Особенность данного заболевания заключается в появлении ломкого сайта FRAXA в районе Xq27.3.

Ломкие сайты хромосом являются обычными элементами генома млекопитающих и человека. Их видно на препаратах метафазных хромосом как разрывы и перетяжки. Все ломкие сайты разделяют на две группы: обычные ломкие сайты и редкие ломкие сайты. Обычные ломкие сайты являются нормальным элементом кариотипа и встречаются у всех индивидуумов. Редкие ломкие сайты возникают в результате мутации – экспансии повторов. Они встречаются в 5% популяции. Ломкие сайты становятся видны на препаратах после обработки клеток рядом веществ, вызывающих репликативный стресс, таких как 5-фтордезоксисуридин, бромдезоксисуридин, дистамицин А или афидиколин. Последнее вещество является ингибитором ДНК-полимеразы α и индуктором большинства обычных ломких сайтов. Ранее было показано, что камптотecin – ингибитор топоизомеразы I, снижает ломкость хромосом, индуцированную афидиколином. Было сделано предположение, что камптотecin, ингибируя плавление ДНК при репликации, не дает образовываться протяженным одноцепочечным участкам, которые являются потенциальной причиной ломкости хромосом. Кроме того указывалось, что, вероятно, обычные ломкие сайты появляются в районах с низкой концентрацией ориджинов в условиях репликативного стресса.

Целью нашей работы было исследование механизма формирования редких ломких сайтов. Мы предположили, что этот механизм может быть аналогичным предложенному для обычных ломких сайтов. Работу прово-

дили на клеточных культурах, полученных из крови пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

В ходе работы мы анализировали активацию репликации в 5' промоторной области гена *FMRI* в присутствии и в отсутствие 5-фтордезоксисуридина, индуктора ломкого сайта FRAXA. Было показано, что даже в отсутствие 5-фтордезоксисуридина, в клеточных линиях пациентов наблюдаются проблемы репликации в районе промотора гена *FMRI*. Нами была предложена модель, описывающая механизм возникновения ломкого сайта FRAXA у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. 5-фтордезоксисуридин является ингибитором тимидилатсинтазы. При попадании в клетки он нарушает баланс нуклеотидов и, тем самым, ингибирует репликацию. В условиях репликативного стресса, увеличенный CGG повтор остается недореплицированным и, таким образом, возникает ломкий сайт.

Биотехнология

<i>Земко В. Ю., Окулич В. К.</i> Анализ пептидогликан-разрушающей активности сыворотки у пациентов с гнойным отитом	3
<i>Кульханова Д. С., Эрст А. А., Новикова Т. И.</i> Биотехнологические подходы для размножения редких лекарственных растений <i>P. Fritillaria</i>	5
<i>Сенько О. В., Степанов Н. А., Мамедова Ф., Маслова О. В.</i> Биомасса макроводорослей как перспективный субстрат для биотехнологического получения органических кислот.....	7
<i>Степанов Н. А., Сенько О. В., Маслова О. В., Ефременко Е. Н.</i> Имобилизованные клетки дрожжей в процессах получения янтарной кислоты	8
<i>Шулаева Л. В., Нечаева Е. А., Зайнутдинов Т. А., Куликов Д. В.</i> Валидация компьютеризированных систем в производстве коревой вакцины в условиях GMP	10
<i>Тихонова А. О., Тойменцева А. А., Шарипова М. Р.</i> Подбор сигнальных пептидов для эффективной гетерологичной секреции бациллярных протеиназ	11
<i>Ястребова А. А., Бураковский А. И., Карпенко Т. А., Тишкевич М. Н.</i> Иммуноферментное определение аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты в сыворотке крови больных сахарным диабетом 1-го типа	12
<i>Адаменко Л. С., Астанин А. И.</i> Дegrаdация фенантрена штаммом <i>Pseudomonas denitrificans</i> в присутствии и в отсутствие детергента tween-20	14
<i>Богомолова Е. Г., Духовлинов И. В., Фёдорова Е. А., Симбирцев А. С.</i> Создание гибридных рекомбинантных белков на основе $\nu p6$ и $\nu p8$ ротавируса человека группы А и изучение их антигенных свойств	16
<i>Добровольская О. А., Федорова Е. А., Черняева Е. К., Духовлинов И. В., Симбирцев А. С.</i> Получение рекомбинантного белка <i>tb10.4 Mycobacterium tuberculosis</i> в клетках <i>Escherichia coli</i>	18

<i>Долгушин С. А., Герасименко А. Ю., Лукин А. С., Одинцова Е. С., Тронин А. В.</i> Разработка набора реагентов для одновременного выявления в сыворотке крови человека иммуноглобулинов класса G к TORCH-инфекциям методом проточной цитофлуориметрии	20
<i>Зонов Е. В., Юнусова А. Ю., Кочнева Г. В., Рябчикова Е. И.</i> Механизмы онколитического действия рекомбинантного апоптин-продуцирующего вируса осповакцины.....	21
<i>Зубарева К. Э., Соловьева А. О., Шестопалов М. А., Повещенко А. Ф., Нечаева Е. А.</i> Наночастицы на основе октаэдрических кластерных комплексов в качестве потенциальных агентов для биовизуализации и фотодинамической терапии	23
<i>Эрст А. А., Новикова Т. И., Дорогина О. В., Банаев Е. В.</i> Биотехнологические подходы получения экологически чистого сырья лекарственных растений	25
<i>Есина Т. И., Мартынова О. Ю., Михайлова В. К., Шими́на Г. Г., Цыпленкова Е. С., Гамалей С. Г., Сысоева Г. М., Левагина Г. М., Даниленко Е. Д.</i> Выбор вспомогательных веществ, обеспечивающих сохранность структуры гранулоцит-колониестимулирующего фактора в составе композиции для перорального применения.....	27
<i>Макушева Ю. С., Рубцова Н. В., Губанова Н. В., Гайтан А. С., Кривошапкин А. Л., Мордвинов В. А.</i> Первичные культуры клеток как модель для исследования глиальных опухолей человека	30
<i>Нуштаева А. А., Коваль О. А., Сакаева Г. Р., Гуляева Л. Ф., Герасимов А. В., Кулигина Е. В., Рихтер В. А.</i> Первичные клеточные культуры рака молочной железы человека как основа при персонализированном подходе лечения онкобольных	31
<i>Разум К. В., Пышина И. А., Троицкий С. Ю., Рябчикова Е. И.</i> Закономерности взаимодействия наночастиц золота и наночастиц палладия с эукариотическими клетками на ультраструктурном уровне.....	35
<i>Соловьева А. О., Зубарева К. Э., Повещенко А. Ф., Нечаева Е. А.</i> Распределение клеток костного мозга после трансплантации в норме и в условиях опухолевого роста	39

Вирусология

<i>Зубенко Н. В., Коротецкий И. С., Шилов С. В., Иванова Л. В.</i> Адаптация штаммов вируса гриппа с различной антигенной структурой к коммерческим противовирусным препаратам	41
<i>Кливлеева Н. Г., Глебова Т. И., Кузнецова Т. В., Шаменова М. Г.</i> Получение моноклональных антител к вирусу гриппа А/АЛМАТЫ/5/98 (H1N1)	45
<i>Клотченко С. А., Тараскин А. С., Плотникова М. А., Егоров В. В., Шалджян А. А., Васин А. В.</i> Применение твердофазного иммуноферментного анализа в формате микрочипа для определения и типирования вирусов гриппа человека	46
<i>Плотникова М. А., Клотченко С. А., Васин А. В.</i> Особенности экспрессии цитокинов клетками А549 на уровне транскрипции и на уровне трансляции при заражении вирусом гриппа типа А	50
<i>Сухоруков В. Н., Сергеева М. В., Степанова Л. А., Цыбалова Л. М.</i> Конструкции на основе флагеллина и эпитопов НА2 для противогриппозной вакцины широкого спектра действия	52
<i>Шилов С. В., Коротецкий И. С., Зубенко Н. В., Иванова Л. Н.</i> Потенцирующее действие комплексов молекулярного йода на коммерческие противовирусные препараты при экспериментальной гриппозной инфекции.....	57
<i>Богачев В. В., Барышев П. Б., Тотменин А. В., Мирджамалова Ф. О., Гашикова Н. М.</i> Выявление мутаций, специфичных для нового генетического варианта <i>crf63_02a1</i> вич-1, распространяющегося в сиби́рском регионе.....	60
<i>Демина А. В., Терновой В. А., Карташов М. Ю., Святченко В. А., Локтев В. Б., Нетесов С. В., Чумаков П. М.</i> Непатогенные энтеровирусы, обладающие потенциальными онколитическими свойствами	62
<i>Замедянская А. С., Титова К. А., Сергеев Ал. А., Кабанов А. С., Булычев Л. Е., Сергеев Ар. А., Галахова Д. О., Нестеров А. Е., Носарева О. В., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П., Сергеев А. Н.</i> Инфекционные свойства вируса натуральной оспы на первичных культурах моноцитов-макрофагов человека и мыши	64

Комиссаров А. Б., Фадеев А. В., Кошелева А. А., Грудинин М. П. Разработка олигонуклеотидных праймеров и зондов для выявления вируса гриппа А подтипа H2N2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени..... 68

Корнеев Д. В. Атомно-силовая спектроскопия одиночных вирусных частиц..... 69

Курская О. Г., Шаршов К. А., Глуценко А. В., Гуляева М. А., Троцкий А. В., Шестопалов А. М., Шкурупий В. А. Перспективы использования нового препарата на основе окисленного декстрана для лечения и профилактики гриппа 70

Сергеев А. А., Титова К. А., Кабанов А. С., Булычев Л. Е., Сергеев А. А., Галахова Д. О., Замедянская А. С., Шишкина Л. Н., Таранов О. С., Омигов В. В., Агафонов А. П., Сергеев А. Н. Сурок как модельное животное для оспы обезьян с целью оценки эффективности противооспенных препаратов 73

Титова К. А., Сергеев Ал. А., Кабанов А. С., Булычев Л. Е., Сергеев А. А., Горбатовская Д. О., Замедянская А. С., Шишкина Л. Н., Таранов О. С., Омигов В. В., Агафонов А. П., Сергеев А. Н. Мышь как модельное животное для натуральной оспы при оценке лечебно-профилактической эффективности препаратов 78

Юрченко К. С., Глуценко А. В. Оценка противоопухолевой активности природных изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации, с целью отбора онколитических штаммов..... 82

Молекулярная биология

Брызгунова О. Е., Григорьева А. Е., Морозкин Е. С., Зарипов М. М., Рябчикова Е. И., Войццкий В. Е., Власов В. В., Лактионов П. П. Сравнительное исследование морфологии и состава микровезикул мочи больных раком предстательной железы..... 85

Жорник Е. В., Баранова Л. А., Волотовский И. Д. Экспрессия генов маркеров воспалительных реакций в лимфоцитах человека под влиянием наночастиц серебра и диоксида титана 86

<i>Максютов Р. А., Трегубчак Т. В., Максютов А. З., Гаврилова Е. В.</i> Создание онколитических вирусов с иммуностимулирующими свойствами.....	88
<i>Никитенко Н. А., Speiseder T., Groitl P., Спирин П. В., Прокофьева М. М., Lam E., Dobner T., Прасолов В. С.</i> Подавление экспрессии генов аденовирусов группы D как возможный подход к лечению аденовирусной инфекции	91
<i>Одинцова Е. С., Баранова С. В., Пархоменко Т. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А.</i> Новые маркеры дифференциальной диагностики ВИЧ-инфекции.....	94
<i>Пономарева А. А., Рыкова Е. Ю., Чердынцева Н. В., Скворцова Т. Э., Брызгалов Л. О., Добродеев А. Ю., Завьялов А. А., Тузиков С. А., Власов В. В., Лактионов П. П.</i> Эпигенетические маркеры рака легкого в циркулирующей ДНК крови: диагностика и мониторинг после терапии	95
<i>Разуваева А. В.</i> Особенности эксцизионной репарации оснований ДНК в различных клеточных компартментах	99
<i>Тутанов О. С., Тамкович С. Н., Григорьева А. Е., Рябчикова Е. И., Лактионов П. П.</i> Сравнительное протеомное исследование экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.....	100
<i>Черепанова А. В., Власов В. В., Лактионов П. П.</i> Ингибирующее действие специфичных олигодезоксирибонуклеотидов на poly(I:C)-индуцированную продукцию провоспалительных молекул первичными и трансформированными клетками	102
<i>Антонец Д. В., Грудин Д. С.</i> Комплекс программ для предсказания Т-клеточных эпитопов и рационального дизайна искусственных поли-эпитопных антигенов.....	103
<i>Бакулина А. Ю., Чикаев А. Н., Волкова Н. В.</i> Поиск структурного соответствия между гликопротеином ВИЧ GP120 и пептидами-имитаторами, полученными методом фагового дисплея	106
<i>Буряченко С. В.</i> Генно-биотические модификации. Нарушение равновесия таутомерных форм ДНК. Генетические дефекты. Нормализация функций дефектных генов непосредственно в организме	108

<i>Григорьева А. Е., Тамкович С. Н., Еремина А. В.</i> Исследование микрочастиц слезной жидкости здоровых людей и пациентов с открыто-угольной глаукомой и диабетической ретинопатией	111
<i>Иванова К. А., Шаньшин Д. В., Сергеев А. А., Щербаков Д. Н.</i> Стратегия создания иммунной библиотеки фаговых мини-антител против ортопоксвирусов	115
<i>Карташов М. Ю.</i> Изучение и генетическое разнообразие риккетсий, выделенных из клещей в различных регионах России.....	117
<i>Кашина Е. В., Антонцева Е. В., Ощепкова Е. А., Ощепков Д. Ю., Фурман Д. П., Мордвинов В. А.</i> Временные и дозозависимые эффекты воздействия 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-диоксида на экспрессию генов цитокинов в макрофаге	121
<i>Косова А. А., Ходырева С. Н., Лаврик О. И.</i> Взаимодействие КУ-антигена с апуриновыми / апиримидиновыми сайтами зависит от структуры ДНК	124
<i>Кузнецова В. В., Кулемзин С. В., Решетникова Е. С., Волкова О. Ю., Мечетина Л. В., Таранин А. В.</i> Роль В-лимфоцитарного шаперона FCRLA в контроле дифференцировки В-лимфоцитов и продукции иммуноглобулинов	125
<i>Львова М. Н., Дужак Т. Г., Жукова М. В., Киселева Е. В., Катохин А. В., Мордвинов В. А.</i> Анализ содержимого кишечника и секреторного продукта печеночного сосальщика <i>Opisthorchis felineus</i>	126
<i>Овчинников В. Ю., Афонников Д. А., Васильев Г. В., Кашина Е. В., Sripa В., Мордвинов В. А., Катохин А. В.</i> Идентификация микроРНК генов плоских червей семейства Opisthorchiidae	129
<i>Пирожкова Д. С., Цыганов М. А.</i> Р-гликопротеины <i>Opisthorchis felineus</i> : идентификация генов и сравнительное исследование их экспрессии.....	130
<i>Помазной М. Ю., Логачева М. Д., Катохин А. В., Мордвинов В. А.</i> Полнотранскриптомный анализ возбудителя описторхоза <i>Opisthorchis felineus</i> методом RNA-SEQ.....	131

<i>Савченко А. М., Бакулина А. Ю., Голосова О. И.</i> Решение задач молекулярной биологии с помощью UNIPRO UGENE	132
<i>Петренко В. А., Тронин А. В., Середина Т. А.</i> Дифференциальная диагностика описторхоза методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	134
<i>Сократян А. М., Баранов К. О., Гусельников С. В., Чикаев Н. А., Волкова О. Ю., Мечетина Л. В., Таранин А. В.</i> Идентификация SLAMF9-рецепторного комплекса	135
<i>Степанов Г. А., Семенов Д. В., Филиппова Ю. А., Нуштаева А. А., Кулигина Е. В., Коваль О. А., Рихтер В. А.</i> Направленная регуляция экспрессии генов в клетках человека с использованием аналогов малых ядрышковых РНК	137
<i>Фаттахов Н. С., Василенко М. А., Куликов Д. И., Скуратовская Д. А., Кириенкова Е. В., Затолокин П. А., Литвинова Л. С.</i> Исследование роли полиморфизма С774Т гена эндотелиальной синтазы оксида азота в реализации эндотелиальной дисфункции при метаболическом синдроме	139
<i>Филиппова Ю. А., Степанов Г. А., Семенов Д. В., Савельева А. В., Коваль О. А., Рабинов И. В., Кулигина Е. В., Рихтер В. А.</i> Влияние синтетических аналогов малых некодирующих РНК на транскрипцию и посттранскрипционное созревание РНК в клетках человека	143
<i>Шаньшин Д. В., Иванова К. А., Щербаков Д. Н.</i> Конструирование нового фагмидного вектора для дисплея вариабельных фрагментов антител	144
<i>Юдкин Д. В.</i> Исследование причин ломкости хромосом у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы	146

Научное издание

**I Международная конференция
молодых ученых: биотехнологов,
молекулярных биологов
и вирусологов**

Сборник тезисов

Оригинал-макет *К. В. Шмугуровой*

Подписано в печать 29.09.2014 г.
Формат 60 × 84 1/16. Офсетная печать.
Уч.-изд. л. 9,7. Усл.-печ. л. 9. Тираж 150 экз.

Заказ № 207
Редакционно-издательский центр НГУ.
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.