



KOLTSOVO/2016

OPEN
BIO

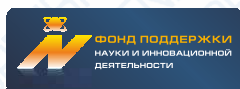
ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

СБОРНИК

ТЕЗИСОВ

III МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО - 2016



Региональный
партнер
Новосибирская
область

Региональный интегрированный центр



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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2016

УДК 577.2:62.01:578+(001)

ББК 28.07:30.16:28.4

М431

М431 III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2016 : Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т. — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2016. — 328 с.

ISBN 978-5-4437-0563-7

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-2016.

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 978-5-4437-0563-7

© АНО «Инновационный центр
Кольцово», 2016

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ЛЕГКИЕ ЦЕПИ АНТИТЕЛ,
ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ГИСТОНЫ*****MONOCLONAL LIGHT CHAINS OF ANTIBODIES
WITH HISTONE-HYDROLYZING ACTIVITY**

С. В. Баранова, В. Н. Бунева, Г. А. Невинский

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

S. V. Baranova, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Division of Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia

e-mail: swb@niboch.nsc.ru

Аннотация

Методом фагового дисплея наработан пул клонов, синтезирующих легкие цепи антител, на базе библиотеки кДНК легких цепей антител больных системной красной волчанкой. Фаговые частицы, продуцирующие легкие цепи антител, аффинной хроматографией на

* Работа поддержана грантами РФФИ №№ 15-04-03245, 16-34-00079, 16-04-00604.

гистон-сефарозе разделены на фракции по сродству к гистонам. Получены моноклональные легкие цепи антител, и показано, что они эффективно гидролизуют гистоны.

Abstract

An immunoglobulins light chains phagemid library derived from peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus was used. Small pools of phage particles displaying light chains with different affinities for histones were isolated by affinity chromatography on Histones-Sepharose. Monoclonal light chains of antibodies were obtained. It was shown that its efficiently hydrolyzed histones.

Важной проблемой современной биохимии и молекулярной медицины является поиск новых маркеров и лекарственных средств лечения аутоиммунных патологий.

Каталитически активные антитела, или абзимы, впервые были обнаружены в крови больных астмой, они гидролизovali интестинальный вазоактивный нейропептид. Позже при ряде других аутоиммунных заболеваний обнаружены аутоантитела, гидролизующие ДНК, РНК, белки и полисахариды.

Системная красная волчанка (СКВ) — системное аутоиммунное полиэтиологическое диффузное заболевание, и в процессе развития заболевания происходит поражение практически всех органов, ассоциированное с образованием большого разнообразия аутореактивных антител. Известно, что томографией у больных СКВ на поздних стадиях заболевания в головном мозге обнаруживаются бляшки, сходные с таковыми у больных рассеянным склерозом. Из этих данных следует, что изменения в клетках головного мозга при этих заболеваниях могут иметь сходный механизм.

Ранее нами было показано, что антитела крови больных системной красной волчанкой специфично гидролизуют ДНК, основной белок миелина и различные олигопептиды его антигенных детерминант. Кроме того, поликлональные антитела из крови больных системной красной волчанкой способны гидролизовать от одного до пяти человеческих гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4). На осно-

вании общепринятых критериев показано, что гидролизующая активность антител из крови больных СКВ является их собственным свойством.

Исследование поликлональных антител крови из-за их гетерогенности позволяет выявить лишь общие закономерности их функционирования, в то время как изучение моноклональных антител дает возможность получить детальную характеристику ферментативной активности каждого отдельного антитела, и поэтому моноклональные антитела являются перспективными препаратами для использования их в диагностике и терапии различных заболеваний.

Целью работы было получение моноклональных каталитически активных антител против гистонов методом фагового дисплея, а также детальное изучение их свойств.

Моноклональные антитела были получены с использованием фаговой библиотеки кДНК лимфоцитов периферической крови больных системной красной волчанкой. Используемая в работе фаговая библиотека содержит кДНК генов легких цепей антител в составе гена белка оболочки рIII нитчатого бактериофага М13. кДНК клонирована в фагмиду рCANTABHis6 после лидерной последовательности гена белка оболочки фага, обеспечивающей транспорт белка в периплазматическое пространство *E.coli*. Библиотека была получена с использованием мРНК лимфоцитов периферической крови больных СКВ и любезно предоставлена С. Полом (США). Гибридный белок экспонируется на поверхности фаговой частицы, что позволяет легким цепям антител связываться с лигандом.

В процессе работы был наработан пул клонов, синтезирующих легкие цепи антител. Аффинной хроматографией на гистон-сефарозе фаговые частицы, продуцирующие легкие цепи иммуноглобулинов против гистонов, были разделены на фракции, отличающиеся сродством к ним. Получены моноклональные легкие цепи. Показано, что легкие цепи активны в гидролизе гистонов.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ КОЗЬЕГО МОЛОКА

BIODIVERSITY OF LACTIC ACID BACTERIA IN GOAT MILK

Н. Ю. Богдан, Г. В. Коев

*Научно-практический Институт плодоводства, виноградарства
и пищевых технологий, лаборатория пищевой биотехнологии*

N. I. Bogdan, G. V. Coev
PSIHFT, Republic of Moldova

e-mail: ninabogdaniurie@gmail.com

Аннотация

Молоко и молочные продукты играют большую роль в питании людей. Лечебные и профилактические свойства молока обусловлены содержанием в нем не только витаминов, микро- и макроэлементов, молочной кислоты, ферментов, минеральных веществ, но и молочно-кислых бактерий.

Abstract

Milk and milk products provide a wealth of nutrition benefits with their healthy contents along with the micro-flora these products carry. Authors were selected strains of lactic acid bacteria from raw goat milk.

Молоко — один из самых ценных продуктов питания человека. Молоко содержит все необходимые для питания человека вещества, которые находятся в сбалансированных соотношениях и очень легко усваиваются организмом. Также молоко представляет собой натуральный источник выделения культур молочнокислых бактерий с важными и ценными для молочной промышленности биотехнологическими свойствами.

Козье молоко как питательный субстрат отличается от коровьего по составу питательных веществ, биологической ценности, по структурным и физико-химическим показателям, обладает относительно высокой кислотностью, которая обусловлена большим содержанием молочных белков и сухих веществ [1]. Также козье молоко отличается от коровьего более богатым содержанием микро-, макроэлементов, витаминов, аминокислот, пониженным содержанием холестерина и выраженными антиоксидантными свойствами. Прослеживаются существенные отличия в количестве и размерах (диаметре) жировых шариков коровьего и козьего молока, что влияет на усвояемость продукта. Жировые шарики в молоке коз мельче коровьих в десятки раз — это также существенно влияет на хорошую усвояемость и быструю перевариваемость козьего молока. Козье молоко отличается низким содержанием лактозы на 13 % меньше, чем в коровьем молоке [2].

Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что козье молоко существенно отличается по своему составу от коровьего молока: общее содержание белка, жира, витаминов, микро- и макроэлементов значительно выше у козьего молока чем у коровьего, а содержание лактозы ниже. Этот аргумент важен для людей с непереносимостью лактозы.

Для производства молочных продуктов используют различные штаммы молочнокислых бактерий. Подбор перспективных видов и штаммов молочнокислых бактерий, обладающих полезными свойствами, дает возможность для разработки научных основ их рационального использования в различных областях промышленности, сельского хозяйства, медицины, ветеринарии, биологии.

Следует учитывать, что результат применения молочнокислых бактерий напрямую зависит от характерных свойств того или иного штамма [3].

Поэтому важное значение приобретает научный поиск высокоактивных штаммов, способных обеспечить оптимальные показатели физиолого-биохимических и технологических свойств.

До настоящего времени в Республики Молдова не проводились научные исследования по целенаправленному изучению микробиологического состава национальных кисло-молочных продуктов и вы-

делению штаммов молочнокислых бактерий с ценными для молочной промышленности биотехнологическими показателями. Данный вопрос актуален в связи с тем, что промышленные штаммы молочнокислых бактерий, депонированные в коллекциях разных стран, в том числе и Республики Молдова, выделены преимущественно из коровьего молока, а в некоторых случаях закваски являются предметом импорта.

Поэтому целью исследований было выделение из спонтанной микрофлоры козьего молока чистых культур молочнокислых бактерий, изучение и отбор перспективных штаммов с ценными биотехнологическими характеристиками для создания новых стартерных культур предназначенных для производства ферментированных молочных продуктов.

Объектом исследований служили образцы козьего молока, полученные из крестьянских хозяйств Севера, Центра и Юга Республики Молдова.

В исследованиях использовались классические микробиологические методы получения чистых культур и идентификации по Берджи, в модификации В. Богданова, Л. Банниковой, Н. Королевой и В. Семенихиной, направленной на отбор перспективных для молочной промышленности штаммов молочнокислых бактерий [4].

Работа по выделению, идентификации и изучению свойств местных промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий, адаптированных к региональным условиям среды и местному сырью приобретает научный интерес. Местные штаммы не только проявляют наибольшую активность в соответствии с характерными условиями окружающей среды, но также наиболее пригодны к употреблению в пищу местным населением. так как благодаря этому расширяются познания в плане экологического биоразнообразия лактобактерий.

Образцы были взяты из разных районов с целью сравнительного анализа и изучения присутствующего видового состава молочнокислых бактерий. Далее производилось обогащение гетерогенной культуры, в стерильном обезжиренном молоке и термостатирование при температуре 25 °C; 30 °C; 45 °C.

Следующим этапом исследований было выделение чистых культур молочнокислых бактерий путем произведения ряда серийных десятичных разведений культур и их посева на плотную питательную среду (агар с гидролизованным молоком); термостатирование 48 часов при температуре $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$. В сумме было отобрано 23 колоний, обладавшие формой, размером и цветом, характерными для молочнокислых бактерий.

Одним из важных показателей для отбора молочнокислых бактерий является способность к активному сквашиванию молока с образованием плотного сгустка с чистым кисломолочным вкусом. Поэтому посев отобранных колоний был произведен в жидкую питательную среду — в 10 мл стерильного обезжиренного молока и термостатирование при температуре $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 24–48 часов для определения времени образования и консистенции сгустка. Опыты показали, что различные штаммы проявляли различную активность в данной среде и время образования сгустка варьировало от 18 часов до 72 часов. Не все штаммы образовывали однородный сгусток без признаков газообразования и с незначительным выделением сыворотки. Из 23 штаммов соответствующий сгусток за 24–48 часов образовали лишь 12 штаммов.

Для подтверждения чистоты культур, а также для последующей идентификации, было проведено микроскопическое исследование клеток. Выделенные штаммы по форме и расположению клеток оказались кокками и диплококками, способными к образованию длинных и коротких цепочек. Полученные данные совпадают с литературными о типичной для молочнокислых бактерий формой и расположением клеток [1].

На следующем этапе исследований каждый из 12 выделенных штаммов был подвергнут проверке по серии тестов для подтверждения его принадлежности к молочнокислым бактериям и идентификации. После ряда тестов на физиолого-биохимические свойства были получены результаты представленные в таблице.

[illegible]

По комплексу физиолого-биохимических тестов было выявлено, что 10 из 12 штаммов принадлежат к молочнокислым бактериям.

Полученные результаты позволили определить таксономическую принадлежность исследуемых штаммов. Таким образом, после проведения идентификации было установлено, что из 10 штаммов молочнокислых бактерий, 5 штаммов относятся к *Lactococcus lactis subsp. lactis*, 4 штамма — *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, 1 штамм — *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*. Все эти признаки указывают на принадлежность 10 выделенных штаммов к мезофильным молочным лактококкам с высокой активностью сквашивания молока. Проведенные исследования позволяют определить производственную ценность выделенных штаммов и рекомендовать к использованию в молочной промышленности.

Литература

1. Степаненко, П. Микробиология молока и молочных продуктов / П. Степаненко. М., 1999. С. 127–170.
2. Guzun, V. Industrializarea laptelui / V. Guzun, Gr. Musteață, S. Rubțov. Chișinău, 2001. P. 51–112.
3. Курбанова М. Биотехнология в молочной промышленности / М. Курбанова. Материалы межд. науч. практ. конф. Кемерово, 2009. С. 192–196.
4. Банникова, Л. Микробиологические основы молочного производства / Л. Банникова, Н. Королева, В. Семенихина. М.: Агропромиздат, 1987. С. 181–267.

СОЗДАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ЗИКА

THE CREATION OF A SYNTHETIC IMMUNOGEN BASED ON THE STRUCTURAL PROTEINS OF THE VIRUS ZIKA

Н. В. Волкова ^{1,2}, Д. В. Шаньшин ¹, Д. Н. Щербаков ^{1,2},
И. Р. Иматдинов¹

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

² *ФГБОУ ВПО Алтайский государственный университет*

N. V. Volkova ^{1,2}, D. V. Shanshin ¹, D. N. Scherbakov ^{1,2}, I. R. Imatdinov¹

¹ SRC VB «Vector», Russia

² Altay State University, Russia

Аннотация

В настоящее время эпидемия Зика стала угрозой всему миру. Вирус Зика передается людям через укусы зараженных комаров рода *Aedes*. Данный патоген может вызывать серьезные неврологические осложнения и врожденные пороки развития у плода. В настоящее время вакцинных препаратов против данного заболевания не существует.

Abstract

Currently Zika epidemic is a threat to the world. The Zika virus is transmitted to humans through the bites of infected mosquitoes of the genus *Aedes*. This pathogen can cause severe neurological complications and congenital malformation in the fetus. At present, vaccine preparations against this disease does not exist.

В настоящее время лихорадка Зика носит эпидемиологический характер в Южной и Центральной Америке, а также в Карибском бассейне (Anthony S. Fauci, M.D., 2016). Существует вероятность заноса и распространения вируса Зика на территорию Российской Федера-

ции, в связи с увеличением потока туристов в страны, эндемичные по данному заболеванию.

Так как в настоящее время не существует инактивированных и субъединичных вакцин против Зика, а применение живых аттенуированных вакцин рекомендовано к применению только на эндемичных территориях, то для защиты населения Российской Федерации необходимо разработать безопасные генно-инженерные вакцины.

Таким образом, целью данной работы является конструирование векторов, обеспечивающих экспрессию структурных белков вируса Зика, потенциально индуцирующих протективный иммунный ответ. Данный подход позволит создать экспрессионную платформу для получения кандидатных субъединичных вакцин.

В ходе биоинформатического анализа генома вируса Зика рассчитана и синтезирована рекомбинантная конструкция, содержащая минигеном указанного вируса, обеспечивающая экспрессию и фолдинг химерного полипептида, аналогичные при вирусной репродукции. В качестве вектора экспрессии использовали плазмиду pHMGFP, содержащую цитомегаловирусный промотор и сигнал полиаденилирования, которые обеспечивают высокий транскрипционный уровень целевого гена. Клонирование проводили по сайтам рестрикции SacI и XbaI, по общепринятым методикам. После подтверждения секвенированием целостности экспрессионной кассеты, рекомбинантные плазмиды использовали для трансфекции культуры клеток HEK293T.

Анализ экспрессии трансфицированной культуры клеток проводили люминесцентной микроскопией по уровню экспрессии GFP белка, в составе открытой рамки считывания плазмиды. Показана специфическая локализация GFP в компартментах клетки (эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи), таким образом, с полученной конструкции происходит транскрипция и синтез химерного полипептида. После оценки уровня экспрессии в дальнейшем планируется провести анализ специфичности синтезируемых полипептидов с использованием вирусспецифических сывороток крови в иммуноблоттинге и/или ТФ-ИФА, а также провести электронную микроскопию культуральной жидкости с целью выявления вирусоподобных частиц.

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА
ТАКРОЛИМУСА МУТАНТНЫМ ШТАММОМ *STREPTOMYCES*
TSUKUBAENSIS T41-5**

**IMPROVEMENT OF *TACROLIMUS* BIOSYNTHESIS
BY A MUTANT *STREPTOMYCES*
TSUKUBAENSIS T41-5 STRAIN**

В. И. Глаголев ¹, Е. Д. Попова ²,
А. И. Овчинников ², В. В. Джавахия ²

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

² *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии наук*

V. I. Glagolev ¹, E. D. Popova ², A. I. Ovchinnikov ², V. V. Dzhevakhia ²

¹ *D. Mendeleev University of Chemical Technology
of Russia, Moscow, Russia*

² *Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology»,
Russian Academy of Sciences*

Аннотация

Иммуносупрессивный препарат такролимус, продуцируемый микроорганизмом *Streptomyces tsukubaensis*, относится к группе природных макролидов и применяется для предупреждения и лечения отторжения аллотрансплантата костного мозга, печени, почек и сердца. Отсутствие в настоящее время высокопродуктивных штаммов-продуцентов субстанции такролимус и эффективных технологий затрудняет его промышленное производство.

С помощью метода многоступенчатого индуцированного УФ-мутагенеза был получен высокоактивный штамм *Streptomyces tsukubaensis* T41–5, продуктивность которого составила 0.25 ± 0.03 г/л субстанции такролимус. После проведения оптимизации компонент-

ного состава ферментационной среды путем добавления в нее дополнительных источников азотного и углеродного питания, продуктивность штамма составила 0.4 ± 0.02 г/л иммуносупрессанта. Добавление в ферментационную среду синтетической адсорбирующей смолы DIAION HP20 в количестве 2 %, а также проведение масштабирования технологии биосинтеза для глубинного культивирования в 100-л биореакторе, связанное с оптимизацией pH (7.0) и концентрации растворенного кислорода (30 %), позволило увеличить концентрацию такролимуса в культуральной жидкости до 1.0 ± 0.1 г/л.

Abstract

Immunosuppressive drug tacrolimus produced by *Streptomyces tsukubaensis* belongs to the group of natural macrolides and is used to prevent or treat the rejection of transplanted liver, kidney, heart, and bone marrow allograft. To date, the lack of highly-productive strains and efficient technologies of tacrolimus biosynthesis complicates the commercial production of this drug.

A high-yield *Streptomyces tsukubaensis* T41–5 strain, which productivity made 0.25 ± 0.03 g/L of tacrolimus, has been obtained by a multi-stage UV mutagenesis. After the optimization of the fermentation medium composition using additional sources of nitrogen and carbon, the strain productivity reached 0.4 ± 0.02 g/L. The addition of a synthetic adsorption resin DIAION HP20 to the fermentation medium in the amount of 2 % and the scaling-up of the process for submerged culturing in a 100-L bioreactor accompanied with the optimization of the medium pH (7.0) and dissolved oxygen concentration (30 %), increased the tacrolimus concentration in a culture broth to 1.0 ± 0.1 g/L.

Впервые такролимус был выделен из культуральной жидкости микроорганизма *Streptomyces tsukubaensis*, обнаруженного в почве в районе г. Цукубы (Япония) [1]. Изначально такролимус использовали в качестве системного препарата для лечения пациентов, перенесших трансплантацию органов, с целью предотвращения отторжения трансплантата. Однако при этом было отмечено, что такролимус вызывал улучшение течения фоновых дерматозов у пациентов, которые получали его в связи с перенесенной трансплантацией. Таким образом, от-

крытие такролимуса привело к лучшему пониманию патогенеза ряда кожных заболеваний, в частности атопического дерматита [2].

В качестве исходного штамма был использован штамм *Streptomyces tsukubaensis* AC-1962. Продуктивность данного штамма составляла менее 0.1 г/л такролимуса. В ходе проведения многоступенчатого индуцированного УФ-мутагенеза с использованием коротковолновой ультрафиолетовой (100–280 нм) лампы Short Wave Ultra-violet Mineralight (США) мощностью 12.5 Вт, расположенной на расстоянии 40 см от облучаемой суспензии, был получен новый высокопродуктивный штамм *Streptomyces tsukubaensis* T41–5, продуктивность которого составила 0.25 ± 0.03 г/л субстанции такролимус.

После проведения оптимизации состава ферментационной среды путем замены мальтдекстрина на кукурузный декстрин, увеличения концентрации глюкозы, а также добавления в ферментационную среду сухих активных дрожжей в концентрации 15 г/л, продуктивность штамма была повышена до 0.4 ± 0.02 г/л.

Проведенное исследование возможности применения синтетических адсорбирующих смол для избирательного связывания такролимуса и уменьшения эффекта самоингибирования показало, что наилучший эффект достигается при использовании синтетической адсорбирующей смолы DIAION HP20 в концентрации 2 % от общего объема ферментационной среды; при этом конечная концентрация такролимуса в культуральной жидкости достигла 0.65 ± 0.04 г/л.

В ходе масштабирования разрабатываемой технологии было изучено влияние уровня pH на биосинтез такролимуса в 100-л биореакторе. Эксперименты проводили на ферментационной среде следующего состава (г/л): глюкоза — 35, кукурузный декстрин — 15, дрожжевой экстракт — 5, кукурузный экстракт сгущенный — 5, сухие дрожжи — 15, CaCO_3 — 2, раствор солей в 100 мл дистиллированной воды ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,4 г, $\text{MgCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 4,2 г, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 1,2 г, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 8,4 г) — 83 мкл, дистиллированная вода — до 1 л. Ферментацию проводили при 27°C. В эксперименте тестировали следующие значения pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0. Согласно полученным данным, наилучшая продуктивность (0.86 ± 0.05 г/л) была получена при поддержании pH на уровне 7.0 (рис. 1).

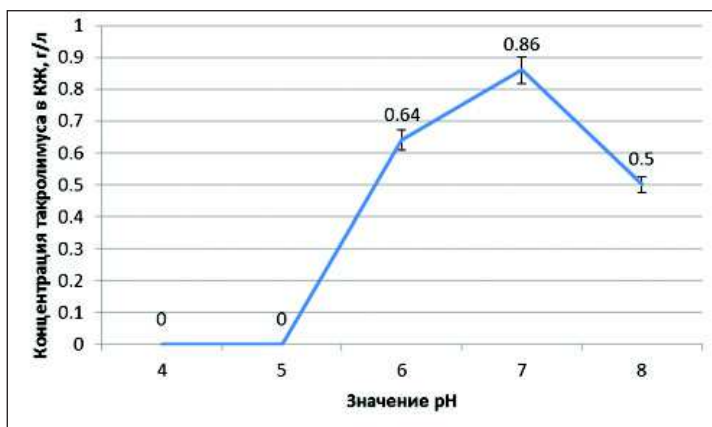


Рис. 1. Влияние значения pH среды на биосинтез такролимуса

Для определения влияния концентрации растворенного в культуральной жидкости кислорода на синтез такролимуса были выбраны следующие значения исследуемого параметра: 15 %; 20 %; 25 %; 30 %; 35 %; 40 %; 45 % и 50 %. Эксперименты были проведены в 100-л биореакторе при 27°C. Согласно полученным данным, наилучшая продуктивность (1.0 ± 0.1 г/л) была достигнута при значении $pO_2 = 30$ % (рис. 2).

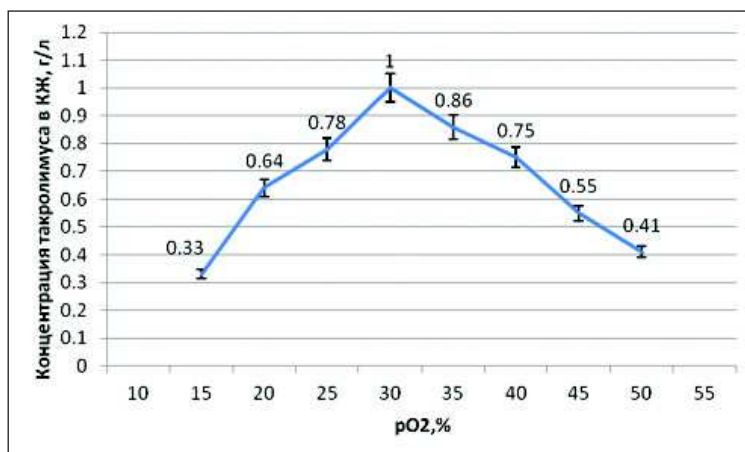


Рис. 2. Влияние значения pO_2 на биосинтез такролимуса

Литература

1. Ruzicka T., Assmann T., Homey B. Tacrolimus: The drug for the turn of the millennium // Arch Dermatol, 1999; №16. С. 574–580.
2. Michel G., Kemeny L., Homey B., Ruzicka T. FK506 in the treatment of inflammatory skin disease: promises and perspectives // Immunol Today 1996; 17. С. 106–108.

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРУЕМОЙ ШТАММОМ GLUCONACETOBACTER HANSENIИ

ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF BACTERIAL CELLULOSE, SYNTHESIZED BY A STRAIN GLUCONACETOBACTER HANSENIИ

А. Г. Демченко, И. Ю. Петрухин, В. В. Каширин

ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России

A. G. Demchenko, I. U. Petruchin, V. V. Kashirin
First MSMU, Russian Federation

Аннотация

Бактериальная целлюлоза, синтезируемая штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, является новым объектом в регенеративной медицине. Матрикс на основе бактериальной целлюлозы может быть получен в форме пленок или в форме сферических пеллет. Бактериальная целлюлоза не обладает цитотоксичностью, что было доказано проведенным МТТ-тестом по методу Т. Моссмана с применением клеточных линий Vero и MCF-7.

Abstract

Bacterial cellulose is synthesized by a strain of *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, a new object is in regenerative medicine. Matrix of bacterial cellulose can be obtained in the form of films or in the form of spherical pellet. Bacterial cellulose has no cytotoxicity, it has been proven MTT assay conducted by the method of T. Mossman using a cell lines Vero and MCF-7.

Бактериальная целлюлоза обладает уникальными свойствами по сравнению с используемыми аналогами, такими, как хитин, хитозан, оксиалканоаты. Она представляет собой природный полисахарид, не содержащий примесей, имеет сетчатую и упорядоченную наноструктуру микрофибрилл, обладает биосовместимостью, эластичностью и гидрофильностью. Бактериальная целлюлоза может быть использована в качестве матрицы для трудно культивируемых клеток эукариот, так как обладает пористой структурой, что способствует прорастанию через нее клеток и сосудов.

Известно, что бактериальную целлюлозу синтезируют небольшое число прокариот, при этом свойства ее могут различаться, поэтому их исследования необходимы для оценки возможности их использования в практике. До настоящего времени основные исследования посвящены полимеру бактериальная целлюлоза, синтезируемому продуцентом *G. xylinum*. Известно, что штаммы вида *Gluconacetobacter hansenii* синтезируют не только бактериальную целлюлозу, но и олигомеры глюкуроновой кислоты [1, 2, 3]. Однако исследования свойств полимера, синтезируемого штаммами *G. hansenii*, малочисленны.

Целью изучения была оценка цитотоксичности бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *G. hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) [4].

В зависимости от условий культивирования штамма *G. hansenii* бактериальную целлюлозу можно получать в форме пеллет сферической формы (при глубинном культивировании) или пленок (при статическом культивировании). Для получения пленок бактериальной целлюлозы штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 культивировали в стационарных условиях на модифицированной среде С. Херсина и М. Шрамма [5] следующего состава, г/л: сахара — 20, пептон —

5, дрожжевой экстракт — 5, Na_2HPO_4 — 2,7, моногидрат лимонной кислоты — 1,15.

Для оценки цитотоксичности бактериальной целлюлозы использовали МТТ-тест по методу Т. Моссмана [6] с применением клеточных линий: эпителий почки зеленой обезьяны-Vero и клетки аденокарциномы молочной железы человека-MCF-7.

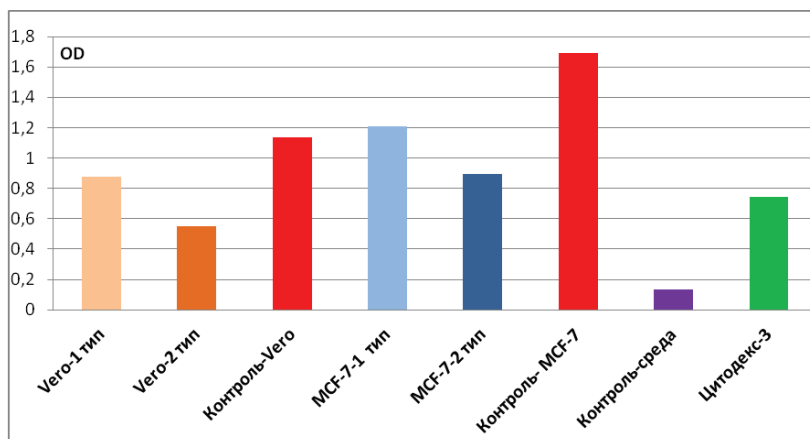
Клетки эукариот засевали в концентрации 15 % от монослоя ($13,5 \cdot 10^3$ -Vero; $9,5 \cdot 10^3$ -MCF-7) на образцы биополимеров в виде круглых мембран с площадью поверхности с одной стороны $0,3 \text{ см}^2$, которые были помещены в отдельные лунки 96-ти луночного планшета (Corning, США). Культивирование проводили в полной питательной среде DMEM (Invitrogen, США), содержащей 10 % телячьей фетальную сыворотку («HyClone Defined», HyClone, США) и 1 % пенициллина/стрептомицина (Thermo). Объем культуральной среды в лунках составлял 250 мкл. Культивирование осуществляли в CO_2 -инкубаторе с концентрацией CO_2 5 %, атмосферного воздуха 95 % и с повышенной влажностью.

Подсчет клеток осуществляли в счетчике TC-10 (Bio-Rad) по протоколу производителя. В качестве контроля использовали клетки на пластике.

Результаты МТТ-теста представлены на рисунке.

В результате исследований установлено, что адгезивная и пролиферативная клеточная активность имеет более высокие показатели при культивировании на всех образцах бактериальной целлюлозы, чем в контроле. Однако наибольшая адгезивная и пролиферативная клеточная активность наблюдалась при культивировании на образцах пленок бактериальной целлюлозы, полученных в результате культивирования в течение 7 суток.

Таким образом, на основании проведенного анализа результатов МТТ-теста можно сделать заключение, что бактериальная целлюлоза не обладает выраженной цитотоксичностью и может применяться в регенеративной медицине.



Показатели МТТ-теста клеточной активности Vero и MCF-7 при культивировании на образцах бактериальной целлюлозы (1 тип — бактериальная целлюлоза, полученная культивированием в течение 7 суток; 2 тип — бактериальная целлюлоза, полученная культивированием в течение 14 суток)

Литература

1. Shah N, Ha J.H., Park J.K.// Biotechnol Bioprocess Eng. 2010. №15. P. 110–8.
2. Jung J. Y., Khan T, Park JK, Chang H. N. //Korean J Chem Eng 2007. №24. P.265–71.
3. Khan S., Shezad O., Khan T., Ha J.H., Park J.K.// Korean Chem Eng Res. 2009. № 47. P. 506–11.
4. Патент РФ.2011. №2415221. Штамм бактерии *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 — продуцент бактериальной целлюлозы. Авторы Громовых Т.И., Фан Ми Хань, Данильчук Т.Н. Заявка № 2011121841. Оpubл. 20.10.2012. Бюлл. № 29.
5. Hestrin S., Schramann M. //Biochemical Journal. 1952. № 58. P. 345–352.

6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of immunological methods. 1983. Т. 65. №. 1–2. С. 55–63.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК БАКТЕРИОФАГА Ф6 ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВ

CREATION OF THE METHOD OF BACTERIOPHAGE Ф6 DOUBLE-STRANDED RNA OBTAINING FOR THE CREATION OF NEW ANTI-INFECTIOUS PREPARATIONS

В. В. Ермолаев, В. П. Клименко, Я. С. Гогина, Л. Р. Лебедев

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

V. V. Ermolaev, V. P. Klimenko, Ya. S. Gogina, L. R. Lebedev
FBRI SRC VB «Vector»

e-mail: ermolaev_vv@vector.nsc.ru,
lebedev_lr@vector.nsc.ru

Аннотация

Разработана методика получения двуспиральной РНК бактериофага ф6 для создания новых противоиных инфекционных лекарственных препаратов. С этой целью оптимизирован метод получения биомассы бактериофага ф6 и разработан метод очистки его дсРНК, позволяющий получать высокоочищенные образцы.

Abstract

The method of obtaining of the double-stranded RNA of the bacteriophage Ф6 for the creation of new anti-infectious preparations has been developed. For this purpose method of obtaining of the bacteriophage Ф6 biomass has been optimized and method of dsRNA

cleaning has been developed, which allows producing highly purified samples.

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) относятся к наиболее массовым и повсеместно распространенным заболеваниям, приводящим к частым осложнениям и большим экономическим потерям. Поэтому разработка новых эффективных противoinфекционных препаратов остается актуальной и стратегической задачей медицины.

Препараты, созданные на основе природных двуспиральных РНК обладают способностью к индукции интерферонов, активируют макрофаги и нейтрофилы, натуральные киллеры, усиливают Т- и В-клеточный иммунный ответ [1,2]. Но препарат Ларифан, действующим началом которого является дсРНК бактериофага F2, отличается широким спектром побочных эффектов; препарат дрожжевой дсРНК Ридостин неэффективен в отношении ряда семейств вирусов.

Альтернативой существующим средствам могут стать препараты на основе дсРНК бактериофага ф6. Фармакотоксические свойства, как показало сравнение, соизмеримы с эффектами препаратов дрожжевой дсРНК (Ридостин). При этом технология получения дсРНК бактериофага ф6 имеет преимущество в уровне продуктивности.

Цель работы состояла в разработке способа культивирования бактериофага ф6 и метода очистки его дсРНК.

Известно, что бактериофаг ф6 имеет размер головки 60 нм и состоит из белков (62 %), РНК (13 %) и липидов (до 25 %). РНК представлена двунитевыми сегментами размером: 6370, 4100 и 3000 п.н. Фаг размножается на культуре грамотрицательной палочковидной фитопатогенной бактерии *Pseudomonas phaseolicola*, оптимальная температура роста которой 23–27°C. Культура-хозяин хорошо растет на природных, синтетических и полусинтетических питательных средах без необходимости в факторах роста. Не патогенна для человека и животных. Одной из особенностей бактериофага ф6 является то, что он проникает в клетку при наличии клеточных пилей общего типа 1. Их формирование определяется генами бактериальной хромосомы, активность которых подвержена фазовым вариациям. Обычно в культуре присутствуют как клетки, несущие пили общего типа 1 (S-форма — чувствительная), так и ли-

шенные их (R-форма — нечувствительная) [3]. Размножению R-клеток способствует выращивание культуры на агаризованной среде, тогда как S-клетки получают преимущество при выращивании культуры в жидкой среде без аэрации. Причина стимуляции пилеобразования в анаэробных условиях в настоящее время неизвестна.

В работах, проведенных ранее, культуру-хозяина выращивали до заражения бактериофагом ф6 методом глубинного культивирования на термостатированной качалке в течение 18 ч до оптической плотности около $3,0 A_{550}$. Выход биомассы бактериофага в этих условиях составлял не более 2 г из 1 литра среды. Это можно объяснить недостаточным присутствием или неактивным состоянием клеточных пилей у *Pseudomonas phaseolicola* на поздней стационарной фазе.

Исходя из данных соображений, для оптимизации способа работы фага ф6 культивирование до инфицирования проводили до середины логарифмической фазы (до оптической плотности $1,0 \pm 0,1 A_{550}$), когда все клетки активно растут и преимущественно содержат пили, при различных скоростях вращения платформы качалки и различных температурах. Культуру клеток *Pseudomonas phaseolicola* инфицировали суспензией бактериофага ф6 из расчета 1 фаговая частица на 100 бактериальных клеток. Культивирование продолжали в течение 16–20 ч при скорости вращения качалки 160 об/мин с сохранением той же температуры до наступления лизиса, который фиксировали по снижению оптической плотности до $0,5–0,7 A_{550}$.

Из полученных фаголизатов удаляли клеточный дебрис при помощи метода центрифугирования и проводили концентрирование бактериофага ф6 в растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000) в присутствии натрия хлорида в течение суток, основываясь на методике Ямамото и соавторов [4]. Биомассу фага ф6 собирали центрифугированием.

Для выделения и очистки дсРНК бактериофага ф6 биомассу, полученную в виде ПЭГ-осадка, суспендировали в физиологическом растворе натрия хлорида и проводили депротеинизацию в растворе натрия додецилсульфата в присутствии хлороформа и изопропилового спирта. Смесь РНК отделяли центрифугированием и разделяли фракционированием в растворах лития хлорида согласно методике Диаза-руиза и Капера [5]. После осаждения дсРНК растворяли в фи-

зиологическом растворе натрия хлорида и дополнительно очищали при помощи гель-фильтрации на колонке с Сефакрилом S-200. Полученные образцы хранили в замороженном состоянии.

Было показано, что выбранная схема культивирования позволяет получать до 3,5 г бактериофага ф6 в виде ПЭГ-осадка из 1 литра культуральной жидкости, а используемая схема выделения и очистки дсРНК фага ф6 — $5,9 \pm 0,8$ мг материала из 1 г ПЭГ-осадка с чистотой препарата до 95–96 %. Спектральные характеристики образцов соответствовали: $A_{260}/A_{280} = 1,95 \pm 0,10$; $A_{260}/A_{230} = 2,0 \pm 0,1$, что также свидетельствует об их высокой чистоте. Показано, что метод позволяет получать до 23,5 мг дсРНК бактериофага ф6 из 1 литра культуральной жидкости.

Таким образом, в ходе выполнения данной работы была разработана эффективная схема наработки бактериофага ф6, выделения и очистки его дсРНК для создания новых лекарственных противовирусных препаратов.

Литература

1. Ершов Ф. И., Шульдяков А. А., Романцов М. Г., Ляпина Е. П., Соболева Л. А. Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. № 10. С. 46–52.
2. Оспельникова Т. П., Миронова Т. В., Полосков В. В., Гариб Ф. Ю., Ершов Ф. И. Влияние индукторов интерферона на цитокиновый профиль // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13. №1. С. 37–40.
3. Adam D. B. and Pugsley A. T. 'Smooth-rough' variation in *Phytomanas medicaginis* phaseolicola BURK // Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science. 1934. Vol. 12. P. 193–202.
4. Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R., Lawhorne L., and Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // Virology. 1970. Vol. 40. P. 734–744.
5. Diaz-ruiz J. R. and Kaper J. M. Isolation of Viral Double-Stranded RNAs Using a LiCl Fractionation Procedure // Preparative Biochemistry. 1978. Vol. 8. N.1. P. 1–17.

**ИНДУКЦИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ
(HAIRY ROOTS) *NITRARIA SCHOBERI*
И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ***

**INDUCTION OF TRANSFORMED ROOTS (HAIRY ROOTS)
OF *NITRARIA SCHOBERI* L. AND PROSPECTS OF THEIR USE**

Т. В. Железниченко¹, Т. И. Новикова¹, Е. В. Банаев¹,
С. В. Асбаганов¹, М. С. Воронкова¹,
Н. А. Мазуркова², Е. И. Филиппова²

¹ ФБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН

² ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»

T. V. Zheleznicenko¹, T. I. Novikova¹, E. V. Banaev¹, S. V. Asbaganov¹,
M. S. Voronkova¹, N. A. Mazurkova², E. I. Filippova²

¹CSBG SB RAS, Russia

²SRC VB «Vector», Russia

e-mail: zhelez05@mail.ru

Аннотация

С помощью *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации получены интенсивно растущие на безгормональных средах культуры “hairy roots” из различных частей проростков *N. schoberi* L., продуцирующие биологически активные вещества, обладающие противовирусной активностью, в частности в отношении РНК-геномного вируса гриппа А человека субтипа H3N2 и высокопатогенного вируса гриппа птиц субтипа H5N1.

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00631 А и гранта Программы Президиума РАН № госрегистрации AAAA-A16-116051110233-0.

Abstract

With *A. rhizogenes*-mediated transformation “hairy root” cultures intensively growing on hormones free media have been obtained from different parts of *N. schoberi* L. plantlets. They produce biologically active substances possessing antiviral activity, in particular in respect of RNA-genomic virus of human A grip, subtype H3N2 and high pathogenic virus of bird grip, subtype H5N1.

Селитрянка (*Nitraria*) — это галофитный кустарник семейства селитрянковые (*Nitrariaceae*). Виды рода *Nitraria* обладают лекарственными свойствами, поскольку богаты флавонолами, дубильными веществами, катехинами, антоцианами, алкалоидами. Листья, плоды и семена некоторых видов часто используются в народной медицине в качестве спазмолитического, антинеуропатического и антиаритмического средства. Экстракты свежих листьев применяются при отравлениях, расстройствах и язвах желудка, гастритах, энтеритах, изжогах, колитах, заболеваниях толстой кишки, а также обладают мощными антиоксидантными свойствами, препятствуя образованию свободных радикалов. В результате недавних исследований установлено цитотоксическое действие листовых экстрактов *N. retusa* на клетки меланомы (Boubaker et al., 2015).

Виды рода *Nitraria*, в частности *N. schoberi*, произрастают на засоленных грунтах пустынь и полупустынь, предгорий, приморских песчано-глинистых низинах, на берегах соленых озер. Особенности биологии вида затрудняют его интродукцию, а сбор лекарственного сырья для получения ценных метаболитов трудно осуществим. В связи с этим, существует необходимость в разработке биотехнологических приемов культивирования *in vitro* с сохранением в них биосинтеза биологически активных веществ (БАВ). Одним из методов активации биосинтеза является трансформация растений грамотрицательной почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, в результате чего формируется культура «бородатого корня», или “hairy roots”. Культуры “hairy roots” характеризуются быстрым ростом на безгормональных питательных средах и способностью продуцировать как ценные метаболиты, характерные для исходного растения, так и вещества, являющиеся их предшественниками или производными.

Цель работы заключалась в *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации частей проростков *Nitraria schoberi*, получении стабильно и интенсивно растущих на безгормональных средах культур “hairy roots”, способных продуцировать биологически активные вещества, и последующей оценке экстрактов культур на противовирусную активность, в частности в отношении вируса гриппа. Культуры “hairy roots” получали при помощи pRi T-ДНК трансформации гипокотилей, семядолей и первичных листьев стерильных двухнедельных проростков, штаммами: A4-RT; R-1601; 8196-RT; 15834 SWISS *A. rhizogenes*, любезно предоставленными Кузовкиной И. Н. (Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Россия). Экспланты инокулировали в течение суток в жидкой питательной среде MS, содержащей суспензию агробактерий *A. rhizogenes* двухсуточного возраста, затем для проявления трансформации помещали на агаризованную среду MS или BDS с добавлением цефотаксима (500 мг/л) и культивировали в условиях пониженного освещения ($10 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). Образовавшиеся бородачатые корни переносили в жидкие питательные среды: $\frac{1}{2}$ MS, MS, B₅, BDS без регуляторов роста. Трансформанты идентифицировали по морфологическим характеристикам, а также методом ПЦР с праймерами к онкогенам агробактерий. Отмечено, что эффективность трансформации зависела от используемого штамма и типа экспланта. Появление адвентивных корней у *N. schoberi* отмечали через неделю инкубации. Культуры “hairy roots” формировались при использовании всех четырех штаммов агробактерий, однако наиболее эффективными являлись 8196-RT и 15834 SWISS. При использовании штамма 15834 SWISS частота трансформации семядолей и гипокотилей составляла 33 %, а первичных листьев — 76,92 %. Инокуляция штаммом 8196-RT была наиболее эффективной, частота трансформации семядолей составляла 62,5 %, а первичных листьев — 100 %. Наблюдалось образование интенсивно ветвящихся корней, их количество на эксплант достигало 11, а длина в среднем — 6 см.

Анализ качественного состава фенольных соединений культур “hairy roots” проводили на образцах с коротким (30 дней) и пролонгированным (74 дня) периодом культивирования с помощью аналитической ВЭЖХ-системы, состоящей из хроматографа «Agilent 1200»

с диодноматричным детектором и системы ChemStation. Разделение проводили на колонке Zorbax SB-C18, размером 4.6×150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. Для разделения катехинов в подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0.1 %) изменялось от 19 до 70 % за 30 мин; от 70 до 100 % с 30 до 32 мин; от 100 до 22 % с 32 до 36 мин. Объем вводимой пробы 5 мкл. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26° С. Детектирование осуществляли при длине волны $\lambda = 270, 280, 290$ нм.

При изучении состава катехинов в экстрактах бородатых корней короткого и длительного культивирования *N. schoberi* методом ВЭЖХ обнаружено 13 соединений катехиновой природы. Сопоставление времен удерживания сигналов веществ на хроматограммах анализируемых образцов с временами удерживания сигналов стандартных образцов и спектров позволило идентифицировать галловую кислоту ($t_R = 2,7$ мин.), $\pm$ -катехин (5,4 мин.), L-эпикатехин (8,6 мин.). Следует отметить, что в корнях длительного культивирования содержание катехинов значительно больше (до 3 %), чем в соответствующих образцах короткого культивирования.

Цитотоксичность и противовирусную активность в отношении РНК-содержащего вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 определяли в водных растворах приготовленных методом высушивания этанольного извлечения биологически активных веществ из измельченного и гомогенизированного сырья. Установлено, что растворы исследуемого растительного экстракта в концентрации $\leq 0,01$ мг/мл не вызывали токсического действия на клеточную культуру MDCK. Показано, что водный раствор этанольного экстракта культуры “hairy roots” *N. schoberi* обладает противовирусной активностью в отношении РНК-геномного вируса гриппа А человека субтипа H3N2 и высокопатогенного вируса гриппа птиц субтипа H5N1 с пандемическим потенциалом в концентрации не менее 0,01 мг/мл в культуре клеток MDCK и в концентрации не менее 1,0 мг/мл в модели экспериментальной гриппозной инфекции у мышей.

Таким образом, полученные данные, показывающие стабильность роста культур, значительное содержание фенольных соединений в образцах пролонгированного культивирования, высокую противо-

вирусную активность экстрактов, свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения культур “hairy roots” *N. schoberi*.

Литература

Boubaker J., Bzeouich I.M., Nasr N., Ghozlen H.B., Mustapha N., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. Phytochemical capacity of *Nitraria retusa* leaves extracts inhibiting growth of melanoma cells and enhancing melanogenesis of B16F10 melanoma. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2015. 15:300

МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПУТЕМ РЕСИНХРОНИЗАЦИИ БИОРИТМОВ ОРГАНИЗМА

METHOD OF TREATMENT BY MEANS RESYNCHRONISATION OF BIORHYTHMS OF THE ORGANISM

П. И. Бабич, В. Н. Зарубин

ООО «Сибирский инновационный центр»

P.I. Babich, V.N. Zarubin

LLC “Siberian innovation center”, Russia

e-mail: sicenter@bk.ru

Аннотация

В работе приведены результаты исследований в области хрономедицины. На базе хронобиологического подхода разработан метод лечения путем ресинхронизации биоритмов организма и аппарат для его реализации. Метод реализует новый принцип управления функциональным состоянием организма.

Abstract

The paper presents the results of research in the field of chronomedicine. On the basis of chronobiological approach developed

method of treatment by means resynchronization of biorhythms of an organism and the apparatus for its implementation. The method implements a new management principle of the functional state of the organism.

Целью работы является научное обоснование разработанного на базе хронобиологического подхода нового принципа управления функциональным состоянием организма и создание на его основе эффективной и безопасной **биомедицинской** технологии лечения путем ресинхронизации биоритмов организма.

Работа базируется на основных положениях науки хронобиологии: принципе ритмичности биологических процессов, свойстве лабильности биоритмов и явлении усвоения внешних ритмов живыми организмами. Согласно фундаментальному свойству живой материи — ритмичности биологических процессов, все физиологические процессы, протекающие в организме, сопровождаются соответствующими колебательными процессами, которые называются биоритмами [1]. Поскольку эти процессы взаимосвязаны, то из этого следует: 1) любое заболевание сопровождается одновременно двумя патологиями: нарушением физиологических процессов в здоровой ткани и отклонением в ней биоритмов от нормы — патологическим десинхронозом (ПД); 2) лечить заболевания можно путем устранения любого патологического процесса, т.к. восстановление одного из них приведет к нормализации другого. Таким образом, согласно принципу ритмичности, все заболевания в организме сопровождаются десинхронозами и лечить их можно путем ресинхронизации (восстановления) нарушенных биоритмов.

Свойство лабильности означает, что частоты биоритмов в организме не являются постоянными величинами во времени, а изменяются в определенных диапазонах. Так, например, частота биоритмов сердечных сокращений в зависимости от состояния организма может находиться в диапазоне 60–90 сокращений в минуту или 1–1,5 Гц. Лабильность биоритмов позволяет организму приспосабливаться и функционировать в экстремальных условиях при различных физических нагрузках, внешних воздействиях и функциональных нарушениях.

Явление усвоения ритма [2] характеризует способность тканей, органов и организма в целом перестраивать свои биоритмы в соответствии с ритмами внешних раздражений и сохранять эти изменения. Такая перестройка возможна благодаря свойству лабильности биоритмов. Явление усвоения ритма мы положили в основу нового принципа управления функциональным состоянием организма путем десинхронизации или ресинхронизации его биоритмов внешними ритмами и тем самым создания или устранения патологических процессов в организме.

При разработке метода лечения путем ресинхронизации биоритмов организма в качестве источника внешних ритмов использовалось электромагнитное поле (ЭМП). С учетом вышеизложенного, принцип новой хронотехнологии лечения заключается в следующем. Если на больную ткань подействовать ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, то, в результате явления усвоения ритма, в больной ткани установятся колебания частотой биоритмов здоровой ткани и произойдет устранение ПД. В результате этого, согласно принципу ритмичности, произойдет нормализация нарушенных физиологических процессов, и наступит выздоровление больной ткани. Соответствие разработки основополагающим научным принципам подтверждается заключением Экспертной коллегии инновационного центра «Сколково» (протокол — П6849 от 16.05.16г.).

Для реализации метода разработан *аппарат* хрономагнитокорректор (ХМК) биоритмов организма. ХМК охватывает лечением все ткани и органы, биоритмы которых попадают в диапазон его рабочих частот. На аппарат получен патент РФ на полезную модель [3]. На способ лечения подана патентная заявка на изобретение [4].

Анализ рынка медицинской техники в сегменте терапия показал, что на нем отсутствуют аппараты с функцией коррекции биоритмов организма. Имеющиеся магнитотерапевтические аппараты работают на частотах, которые подобраны эмпирическим путем или определены косвенными методами без учета роли биоритмов в организме. Поэтому они не могут гарантировать получение только положительного терапевтического эффекта. Так, например, при попадании частоты ЭМП в диапазон биоритмов больной ткани срабатывает явление ус-

воения ритма для здоровой ткани, происходит десинхроноз и обострение болезни. В отличие от магнитотерапевтических аналогов, высокая эффективность лечения на ХМК достигается за счет отсутствия побочных эффектов и комплексного воздействия на организм 2-мя методами: ресинхронизации биоритмов и обычной магнитотерапии. Функция хронотерапии позволяет восстанавливать биоритмы больной ткани, а функция магнитотерапии оказывает на нее дополнительное стимулирующее воздействие и тем самым ускоряет процесс выздоровления.

Использование метода ресинхронизации биоритмов в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата показывает, что в зависимости от вида заболевания, положительная динамика увеличивается на 10–12 %, сроки лечения сокращаются на 10–15 %, значительно снижается употребление лекарственных препаратов. При лечении, например, заболеваний желудочно-кишечного тракта эффективность хронотерапии достигает 94 %. В настоящее время продолжаются биомедицинские исследования и отработка методик лечения по отдельным патологиям.

Литература

1. Загускин С.Л. Ритмы клетки и здоровье человека // Монография. Ростов-на-Дону, ЮФУ, 2010. 292 с.
2. Ухтомский А.А. Усвоение ритма в свете учения о парабиозе // Избранные труды. Под ред. Е.М. Крепса. Ленинград: Издательство «Наука», 1978. Серия «Классики науки».
3. Зарубин В.Н., Семин М.М. Магнитоимпульсный низкочастотный терапевтический аппарат // Патент РФ на полезную модель № 120878. Приоритет 10.01.12.
4. Зарубин В.Н. Способ терапевтического воздействия низкочастотным импульсным ЭМП // Патентная заявка на изобретение №2015123959, 19.06.15.

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ
FC-ИНЖИНИРИНГА***

**DEVELOPMENT OF RECOMBINANT ANTIBODY PRODUCTION
TECHNOLOGY SUITABLE FOR FC-DOMAIN ENGINEERING**

А. В. Зыбкина, И. Р. Иматдинов, О. А. Полежаева, Д. Н. Щербаков

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

A. V. Zybkina, I. R. Imatdinov, O. A. Polezhaeva, D. N. Scherbakov
SRC VB "Vector", Russia

e-mail: zybkina_av@vector.nsc.ru

Аннотация

Конструирование генно-инженерной платформы, позволяющей получить рекомбинантные моноклональные антитела для терапии и диагностики.

Abstract

Designing platform for obtaining recombinant monoclonal antibodies for therapy and diagnosis.

Иммуноглобулины являются неотъемлемой частью гуморального иммунитета, обеспечивая защиту от таких вирусных патогенов как грипп, краснуха, гепатит В, а также ряда особо опасных заболеваний, среди которых лихорадка долины Рифт, желтая лихорадка и Эбола.

Вирус Эбола — представители семейства Filoviridae, вызывающие геморрагическую лихорадку Эбола у высших приматов.

* Работа поддержана проектом РФФИ, номер проекта 16-34-00263.

В последние годы было несколько серьезных эпидемий, в ходе которых заболели порядка 30 тыс. человек, из которых умерли более 12 тыс. В виду отсутствия эффективной зарегистрированной вакцины против Эбола, продолжаются работы по созданию терапевтических препаратов, в том числе с использованием специфических иммуноглобулинов. Так зарубежный экспериментальный препарат ZMAPP, состоящий из трех моноклональных антител, показал 100 % эффективность на макаках и 70 % у инфицированных людей.

Таким образом работы, связанные с получением рекомбинантных антител против Эбола являются актуальными и необходимыми для национальной безопасности. На момент начала работ имелось небольшое число охарактеризованных вируснейтрализующих антител против вируса Эбола, нами, как перспективные в дальнейшей работе, были выбраны 16f6(mouse) и kz52(human) (Pettitt, 2013; Oswald, 2007).

В ходе биоинформатического анализа были рассчитаны 2 экспрессионные конструкции, представляющие собой константные части тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, при этом в ходе конструирования была проведена оптимизация кодонов, в аминокислотные последовательности были внесены охарактеризованные мутации, увеличивающие период полураспада и улучшающие эффекторные свойства Fc-фрагментов антител (Strohl, 2009; Vaccaro, 2005; Labrijn, 2009). Полученные конструкции были синтезированы и клонированы в составе плазмидного вектора под контролем цитомегаловирусного промотора. Независимо были рассчитаны нуклеиновые последовательности, кодирующие вариабельные домены легких и тяжелых цепей антител 16f6 и kz52 с оптимизацией кодонного состава и соответствующими сайтами рестрикции (EcoRI/PspLI, EcoRI/ApaI) для возможности клонирования в экспрессирующий вектор. Вариабельные домены были клонированы в конструкции, содержащие константные части антител, целостность рамок считывания подтверждена секвенированием. Полученные плазмиды были наработаны в препаративных количествах и использованы для котрансфекции (легкая+ тяжелая цепи) культуры клеток HEK293T.

В дальнейшем культуральная жидкость будет использована для аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе для наработки рекомбинантных моноклональных антител с целью изучения их вируснейтрализующих свойств с использованием псевдотипированных гликопротеином Gp вируса Эбола функциональных лентивирусных частиц.

Литература

1. Labrijn A.F. et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo* //Nature biotechnology. 2009. T. 27. №. 8. С. 767–771.
2. Oswald W.B. et al. Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys // PLoS Pathog. 2007. Vol. 3. № 1. P. e9.
3. Pettitt J. et al. Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail //Science translational medicine. 2013. V. 5. №. 199. P. 199ra113–199ra113.
4. Vaccaro C. et al. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels //Nature biotechnology. 2005. V. 23. № 10. P. 1283–1288.
5. Strohl W.R. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies //Current opinion in biotechnology. 2009. V. 20. № 6. P. 685–691.

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОДЕЛЕЦИЙ ЛОКУСА AZF
Y-ХРОМОСОМЫ В ПОПУЛЯЦИОННОЙ ВЫБОРКЕ
КАЗАХСТАНА**

**DISTRIBUTION OF AZF Y-CHROMOSOME LOCUS
MICRODELETIONS IN KAZAKH POPULATION SAMPLE**

А. Д. Каиржанова, Д. К. Камалова, В. Б. Шведюк, А. Б. Шевцов

РГП «Национальный центр биотехнологии», Астана, Казахстан

A. D. Kairzhanova, D. K. Kamalova, V. B. Shvedyuk, A. B. Shevtsov
National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

apple_sk@mail.ru

Аннотация

Представлены результаты, полученные при тестировании 138 образцов ДНК мужчин с использованием разработанной тест-системы. Описаны результаты распределения микроделеций AZF локуса Y хромосомы в популяционной выборке Казахстана. У мужчин с олигозооспермией делеции AZF локуса были обнаружены в 11 % случаев. В группе мужчин с азооспермией, общее количество которых составило 45 человек, делеции в субрегионе AZF были обнаружены у семи мужчин (в 16 % случаев).

Abstract

The results obtained from the testing of 138 male DNA samples using developed test-system. The distribution results of Y-chromosome AZF locus microdeletions are described in Kazakh population sample. Deletion of AZF locus in males with oligospermia was found in 11 % of cases. In the group of 45 males with azoospermia deletions in the AZF subregion were found in seven males (16 % of cases).

Бесплодие является распространенной проблемой здравоохранения. По оценкам Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) около 140 млн. человек во всем мире страдают данным недугом [1]. Прогнозируется, что в ближайшем будущем 1 из 6 пар пытающихся зачать ребенка будет иметь трудности с наступлением беременности. В этиологию бесплодия может быть вовлечен как женский, так и мужской организм. Проблема мужского бесплодия является ключевой в репродуктивной андрологии. Микроделеции длинного плеча Y- хромосомы, связаны с нарушением сперматогенеза [2], являются наиболее частой генетической причиной тяжелой олигозооспермии 5–10 % [3] и азооспермии 10–15 % [4].

Благодаря методическим рекомендациям Европейской Ассоциации Андрологов (ЕАА) тестирование Y- хромосомы стало более надежным в различных генетических лабораториях, способное обнаруживать более 95 % клинически значимых делеций [5]. Высокая диагностическая значимость и востребованность молекулярно-генетического тестирования микроделеций Y хромосомы, актуализирует разработку отечественных тест-систем с использованием рекомендаций международных ассоциаций.

В нашем исследовании для поиска микроделеций в локусе AZF в качестве генетических маркеров были выбраны 6 STS маркеров рекомендованных Европейской ассоциацией андрологов и 2 контрольных гена для контроля ингибирования реакции и наличия Y хромосомы. К выбранным STS маркерам были подобраны праймеры с учетом последующего мультипликсирования ПЦР тест-системы.

Подобранные праймеры были комбинированы в две панели А и Г. Панель А включала в себя 3 пары праймеров к селективным маркерам микроделеций, AZFa (sY86-размер амплифицируемого продукта 350 пар нуклеотидов (п.н.)), AZFb (sY127 — 192 п.н.), AZFc (sY255 — 132 п.н.), в качестве внутреннего контроля использовали праймеры к ZFX/Y (591 п.н.). Панель Г включала праймеры к маркерам микроделеций AZFa (sY84 — 241 п.н.), AZFb (sY134 — 303 п.н.), AZFc (sY254 — 162 п.н.) и для контроля фрагмента короткого плеча Y хромосомы были использованы

праймеры подобранные к STS маркеру sY14 локализованного в SRY гене (470 п.н.).

Молекулярно-генетические исследования 138/10 случаев (7,2 %) обнаружены микроделеции *в различных локусах гена AZF Y хромосомы*, по меньшей мере, одного из STS маркера. У 36 мужчин с олигозооспермией делеции AZF локуса были обнаружены у четырех пациентов, что составило 11 %. В группе мужчин с азооспермией, общее количество которых составило 45 человек, делеции были обнаружены у семи мужчин (в 16 % случаев) в субрегионе AZF. У пациентов с диагнозом астенотератозооспермия и других формах патозооспермии делеции не обнаружены. В контрольной группе фертильных мужчин, общее количество которых составило 40 человек, микроделеции AZF локуса также не были обнаружены.

Согласно литературным данным микроделеция в субрегионе AZF с — выявляется в 75–80 % случаев; в субрегионах AZF b+c — 20–22 %; в субрегионе AZF a — 3–5 % случаев. При азооспермии микроделеции в AZF регионе выявляются в 12–15 % случаях, при олигозооспермии в 8–10 % случаях [6].

В результате наших исследований было определено, что наиболее часто встречалась микроделеция AZF с — субрегиона в 63 % (7 мужчин), микроделений AZF b+c в 10 % (1 человек). Делеция AZFc+AZFb+AZFa была обнаружена у трех человек, что составило 27 % от общего числа выявленных микроделений, в субрегионах AZFa, AZFb микроделеции не выявлены. Результаты полученные при тестировании 138 образцов ДНК мужчин с использованием разработанной тест-системы полностью совпали с результатами полученными при использовании протокола Европейской Ассоциации Андрологов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности разработанного протокола, а также показывает частоту микроделений AZF — локуса хромосомы Y у мужчин с различными нарушениями сперматогенеза (7,2 %), что совпадает с исследованиями других авторов [7, 8].

Литература

1. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) // Revised Glossary on ART Terminology. 2009.
2. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm // Hum. Genet. 1976. Vol. 34. P. 119–124.
3. Foresta, C., A. Garolla, et al. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection // J Clin. Endocrinol. Metab. 2005. Vol. 90. P. 152–156.
4. Dohle G.R., Halley D.J., et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia // Hum. Reprod. 2002. Vol. 17. P. 13–26.
5. Krausz C, et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // Andrology. 2014. Vol 2. P. 5–19.
6. Shi Y.C., Cui Y.X., Wei L. et al. AZF microdeletions on the Y chromosome in infertile Chinese men: a five-year retrospective analysis // Zhonghua Nan Ke Xue. 2010. Vol.16. P. 9.
7. R. Suganthi., V.V. Vijesh., S. Jayachandran., J. Ali Fathima. Multiplex PCR based screening for microdeletions in azoospermia factor region of Y chromosome in azoospermic and severe oligozoospermic south Indian men // Iran J Reprod Med. 2013. Vol. 11. P. 219–226.
8. T. Miyamoto, G. Minase, K. Okabe, H. Ueda, K. Sengoku. Male infertility and its genetic causes // J. Obstet. Gynaecol. Res. 2015. Vol. 41. P. 1501–1505.

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
НА БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ШТАММОМ
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS LB-50**

**EFFECT OF GROW CONDITIONS ON EXOPOLYSACCHARIDE
BIOSYNTHESIS BY *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*
LB-51 STRAIN**

А. А. Карташев, Г. В. Коев

*Научно-практический Институт Садоводства, Виноградарства
и Пищевых Технологий, Республика Молдова*

A. A. Cartasev, G. V. Coev

Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technology

e-mail: cartasev@gmail.com

Аннотация

Целью данного исследования было оценить влияние температуры культивирования и сахарозы на биосинтез экзополисахарида. Штамм *S. thermophilus* LB-50 был выделен из молдавского сырого молока и идентифицирован по микробиологическим и биотехническим критериям. Большое количество EPS было получено при 32 ° C — 72 мг/100 г, а при 2,5 % сахарозы — 66 мг/100 г.

Abstract

The aim of this research was to evaluate the effect of incubation temperature and sucrose on exopolysaccharide (EPS) biosynthesis. The strain of *S. thermophilus* LB-50 was isolated from Moldavian raw milk and was identified according to microbiological and biotechnological criteria. The high amount of EPS has been shown at 32°C — 72 mg/100g and at 2.5 % of sucrose — 66 mg/100g.

Молочнокислые бактерии *Streptococcus thermophilus* относится к группе непатогенных микроорганизмов, используемых в качестве заквасок для производства кисломолочных продуктов, таких как йогурт и др. [1]. Штаммы *Streptococcus thermophilus*, в зависимости от вида, способны продуцировать умеренно вязкие экзополисахариды (ЭПС), которые образуют плотный сгусток без отделения сыворотки во время хранения продукта. Было установлено, что продуцирование ЭПС штаммами термофильного стрептококка улучшает вязкость и текстуру, а также влагоудерживающую способность [2]. Кроме того, было доказано, что ЭПС благотворно влияют на здоровье человека обладая пребиотическими свойствами [4]. Синтез ЭПС молочнокислыми бактериями относительно низкий от 50 mg/L до 400 mg/L [5]. Продуцирование ЭПС штаммами *Streptococcus thermophilus* связано с условиями культивирования, таких как pH, температура и источник углерода, которые значительно увеличивают выход ЭПС [6].

Целью исследований было изучение различных условий культивирования (температуры и сахарозы), влияющих на увеличение биосинтеза ЭПС штаммом *S. thermophilus* LB-50.

Штамм *S. thermophilus* LB-50 был выделен из молока на территории Республики Молдова, идентифицирован по морфо-культуральным и физиолого-биохимическим характеристикам. В данной работе изучение влияния дополнительного источника углерода на синтез ЭПС проводилось в стационарных условиях культивирования на обезжиренном молоке с добавлением сахарозы 2,5 %. Параллельно проводили контрольное культивирование без обогащения среды. Ферментация инициировалась внесением 3 % инокулята изучаемого штамма концентрацией клеток 1×10^8 КОЕ/мл. Влияние температуры культивирования на синтез ЭПС изучалось при температурах 32, 37 и 42°C. Выделение и очистка ЭПС проводилось путем удаления белка осаждением трихлоруксусной кислотой, с последующим осаждением ЭПС этанолом и центрифугированием при температуре 4 °C. Количество ЭПС определяли гравиметрически.

Известно, что *S. thermophilus* обладает высокой способностью ферментировать лактозу с образованием молочной кислоты. Сахароза сбраживается с более низкой эффективностью, но при этом явля-

ется дополнительным источником углерода для развития молочнокислых бактерий.

Результаты, представленные на рис. 1, демонстрируют зависимость времени культивирования и количество ЭПС, выделяемые штаммом *S. thermophilus* LB-50. На среде, обогащенной сахарозой количество ЭПС намного выше, чем при культивировании в обычных условиях при оптимальной температуре 40 °С. Дополнительный источник углерода не повлиял на время образования характерного молочного сгустка при pH 4,5. Также установлено, что наращивание кислотности негативно влияет на образование ЭПС.

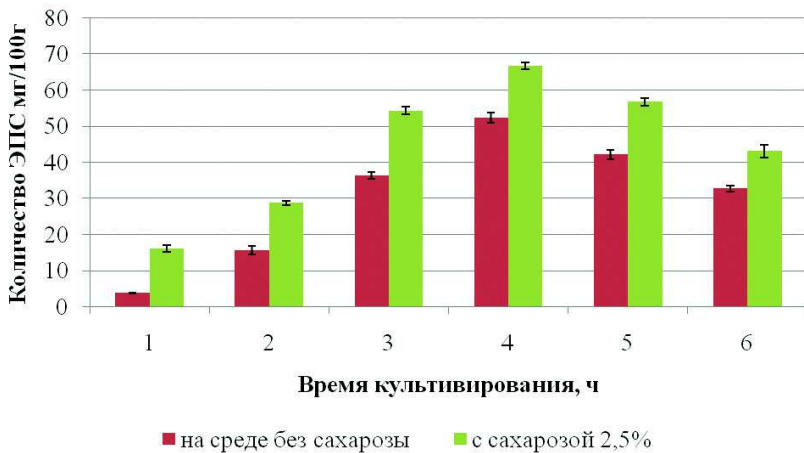


Рис. 1. Динамика синтеза ЭПС в процессе культивирования штаммом *S. thermophilus* LB-50

Температура считается одним из важных факторов влияющий на рост, развитие и синтез ЭПС бактерий вида *S. thermophilus*. Считается, что выделение ЭПС штаммом *S. thermophilus* увеличивается с понижением температуры культивирования. Предполагается, что ЭПС выполняет защитную функцию клетки в неблагоприятных условиях.

На рис. 2 представлены результаты образования ЭПС штаммом *S. thermophilus* LB-50. Культивирование штамма при температуре

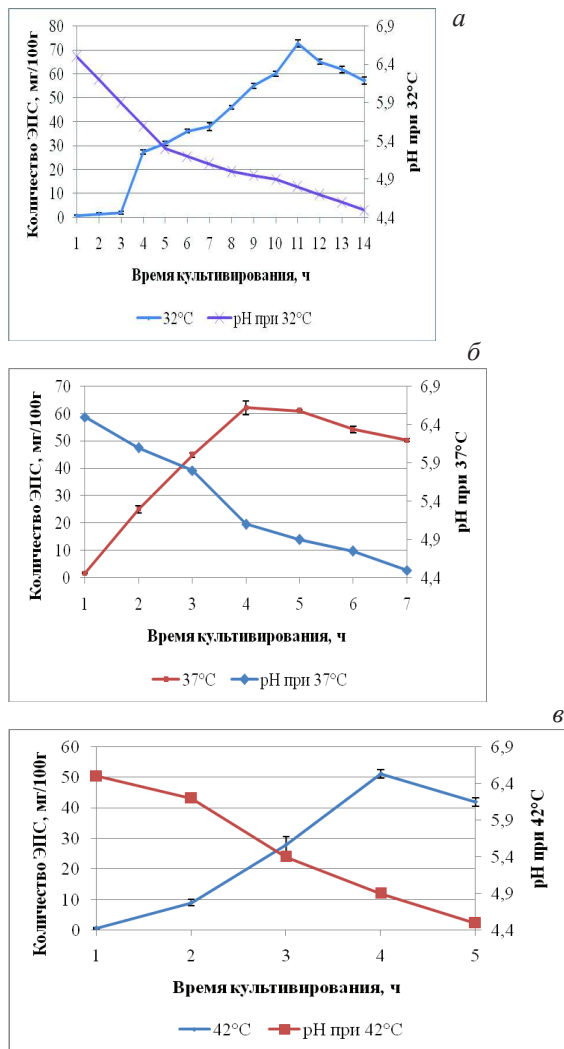


Рис. 2. Влияние температуры на образование ЭПС штаммом *S. thermophilus* LB-50

лока штамм *S. thermophilus* LB-50 выделяет ЭПС в молочную среду при исследованных условиях стационарного культивирования.

32 °C (рис. 2, а) дает наибольший выход ЭПС в молочной среде — 72 мг/100 г, при этом наблюдалась высокая вязкость и слизкость молочного сгустка, а так же очень длительное время культивирования — 14 ч. При 37 °C и 42 °C максимальное количество ЭПС образовалось через 4 часа культивирования штамма *S. thermophilus*, причем количество ЭПС при температуре 37 °C составило 66 мг/100 г. Общее время с начала культивирования при pH 6,5 до образования характерного молочного сгустка, как видно из рис. 2, б и 2, в, составило 7 при 37 °C и 5 ч при 42 °C.

В заключении можно отметить, что выделенный из мо-

Также продемонстрировано, что оптимальное количество ЭПС синтезируется штаммом *S. thermophilus* LB-50 при температуре 37 °С. Что касается дополнительного источника углерода установлено, что сахароза благоприятно влияет на синтез ЭПС. Полученные данные могут помочь предприятиям молочной промышленности получать натуральные кисломолочные продукты не используя при этом стабилизирующие системы.

Литература

1. Iyer, R., Tomar, S. K., Uma Maheswari, T., & Singh, R. (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 20(3), 133–141.
2. Cartasev A. (2016) Yoghurt made by exopolysaccharide producing moldavian origin strains of lactic acid bacteria. Journal of Food and Packaging Science, Technique and Technologies, №9, P. 39–41.
4. Pan, D., & Mei, X. (2010). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. Carbohydrate Polymers, 80(3), 908–914.
5. Svensson, M., Waak, E., Svensson, U., & Rådström, P. (2005). Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. Applied and Environmental Microbiology, 71(10), 6398–6400.
6. Zisu, B., & Shah, N. P. (2003). Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. Journal of Dairy Science, 86(11), 3405–3415.

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И МПЦР

DETECTION MYCOPLASMA CONTAMINATION OF THE CELL CULTURE AND BY MICROBIOLOGICAL METHODS AND MPCR

Н. С. Куцерубова

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

N. S. Kutserubova
SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Риск контаминации микоплазмами клеточных культур, сывороток, питательных сред, используемых при производстве вакцин, и их выявление является на сегодняшний день актуальной проблемой при разработке вакцин и их промышленном выпуске. Создание быстрой диагностики для выявления микоплазм является основной задачей данной работы. В статье отражен сравнительный анализ существующего культурального метода выявления микоплазм и альтернативного метода ПЦР.

Abstract

The risk of contamination with by mycoplasmas cell cultures, serums, culture media used in the production of vaccines, and their identification is today an urgent problem in the development of vaccines and their industrial output. Creation of rapid diagnostics for the detection of mycoplasma is the main objective of this study. The article reflects the comparative analysis of the existing culture of mycoplasma detection method and the alternative method PCR.

Одна из серьезных проблем использования культур клеток при производстве вакцин, биологических препаратов связана с контамини-

нацией их различными агентами. В качестве контаминантов выступают вирусы, бактерии, значительное место занимают микоплазмы [1–4, 6]. Источником контаминации могут быть сыворотка крови, питательные среды, трипсин, инструменты, лабораторные животные и сами сотрудники лабораторий [3, 5, 6]. По литературным данным [1, 7], 99 % штаммов микоплазм, выделенных из 1374 клеточных культур, оказались микоплазмами человека, крупного рогатого скота и свиньи. Наиболее распространенным источником контаминации является внутрилабораторная передача инфекции из воздуха помещений и/или от персонала, от используемого лабораторного оборудования, от одной культуры клеток к другим. Так, в результате работы в одном боксе с инфицированной клеточной культурой ранее стерильные линии клеток, как правило, оказываются контаминированными [8].

Испытанию на отсутствие посторонних агентов подлежат производственные клеточные культуры; объединенный вирусный сбор, полученный при приготовлении вакцинного штамма, посевного вируса для живых и инактивированных вирусных вакцин; объединенный вирусный сбор каждой серии живых вирусных вакцин.

Цель настоящего исследования: разработка метода выявления микоплазменной контаминации культур клеток, вакцин и биологических препаратов с помощью МПЦР и проведение сравнительных исследований двух альтернативных методов: культурального, основанного на культивировании образцов биологического материала в селективных жидких и с добавлением агара питательных средах в аэробных и анаэробных условиях и альтернативный — полимеразная цепная реакция (ПЦР).

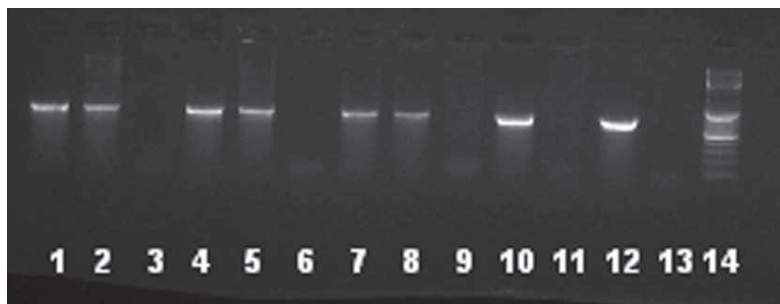
В процессе изучения нормативной документации МУК 4.1/4.2.588–96, European Pharmacopoeia 7.0. Council of Europe, 2010. Vol. 1, ГФ XIII изд., т. 2. ОФС.1.7.20031.15 «Испытание на присутствие Микоплазм» для проведения экспериментальных работ культуральным методом была выбрана за основу компонентная полужидкая питательная среда для выделения и культивирования микоплазм с содержанием 0,3 % агара (среда Каган полужидкая). Данная питательная среда считается чувствительной и признается годной,

если не позднее 7 суток инкубации, визуально обнаруживается рост штамма *Mycoplasma arginini* G 230 (OCO) в разведении не менее, чем 10^{-6} – 10^{-7} (не более 100 — 10 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц) при температуре 36 ± 1 °C.

При проведении контроля методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) был использован разработанный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» экспериментальный набор реагентов, который позволил выявить следующие виды микоплазм: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma buccale*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pulmonis*, *Mycoplasma salivarium*.

Для обнаружения микоплазм культуральным методом и ПЦР были использованы клеточные культуры Vero, Нер, MDCK и сыворотка эмбриональная телячья Gibco, в качестве отрицательного контроля использовались клетки, в которых была добавлена сыворотка эмбриональная телячья Gibco, контаминированная штаммом *Mycoplasma arginini* G-230 (OCO) 1000–100 КОЕ/мл (разведение 10^{-5} – 10^{-6}) (см. рис.).

Оба метода показали хорошие результаты; при культуральном методе на 3 сутки инкубации посевов был выявлен отличный рост контаминированных культур клеток и непосредственно сыворотки эмбриональной телячьей Gibco. Результаты ПЦР приведены на рисунке.



Результаты ПЦР на выявление микоплазм в клеточной культуре

1. Сыворотка эмбриональная телячья Gibco контаминированная Mycoplasma arginini G-230 1000 КОЕ/мл.
2. Сыворотка эмбриональная телячья Gibco контаминированная Mycoplasma arginini G-230 100 КОЕ/мл.
3. Сыворотка эмбриональная телячья Gibco стерильная.
4. Культура клеток Vero с внесением сыворотки эмбриональной телячьей Gibco контаминированной Mycoplasma arginini G-230 1000 КОЕ/мл.
5. Культура клеток Vero с внесением сыворотки эмбриональной телячьей Gibco контаминированной Mycoplasma arginini G-230 100 КОЕ/мл.
6. Культура клеток Vero стерильная.
7. Культура клеток MDSK с внесением сыворотки эмбриональной телячьей Gibco контаминированной Mycoplasma arginini G-230 1000 КОЕ/мл.
8. Культура клеток MDSK с внесением сыворотки эмбриональной телячьей Gibco контаминированной Mycoplasma arginini G-230 100 КОЕ/мл.
9. Культура клеток MDSK стерильная.
10. Культура клеток Нер с внесением сыворотки эмбриональной телячьей Gibco контаминированной Mycoplasma arginini G-230 1000 КОЕ/мл.
11. Культура клеток Нер стерильная.
12. K⁺ положительный контроль.
13. K⁻ отрицательный контроль.
14. M — маркер молекулярного веса.

Вывод: В процессе экспериментальных работ показана возможность использования в качестве экспресс метода метод ПЦР для выявления микоплазм в культуре клеток, биологическом материале, используемом для производства вакцин, что в приводит к значительному ускорению получения результата в отличие от микробиологического метода, постановка которого занимает до 21 суток.

Литература

1. Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. М. 1995. 288 с.
2. Смирнова Т.Д., Миллер Г.Г., Неустроева В.В., Раковская И.В. Рекомендации по предупреждению внутрилабораторной контаминации клеточных культур микоплазмами и методы проверки клеточных культур на контаминацию микоплазмами. Л., 1987. С. 9–19.
3. Смирнова Т.Д., Фридлянская И.И. Контаминация клеточных культур микоплазмами: методы обнаружения и возможные пути распространения микоплазма-инфекции // Цитология. 1985. Т. 27. № 3. С. 276–281.
4. Шалунова Н.В., Меркулов В.А. и др. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов // Ведомости НЦЭСМП. 2013. № 1. С. 28–32.
5. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Меркулова Н.А., Арэ А.Ф. Обнаружение и идентификация микоплазменных заражений методом ДНК-гибридизации // Цитология. 1987. Т. 29.- № 8. С. 934–941.
6. Усова С.В., Богрянцева М.П., Куцерубова Н.С., Гамидова И.С., Радаева И.Ф., Нечаева Е.А. Контаминация микоплазмами культуральных вирусных вакцин // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия Биология, клиническая медицина. 2014. Т. 12. № 4. С. 59–67.
7. Barile M. F. Mycoplasma and cell cultures. Nat.Cancer Inst. Monogr., 1968. Dec., 29. P. 201–204.
8. Barile M. F. Mycoplasma infections of cell cultures // Isr.J.Med.Sci. 1981. Jul. 17 (7). P. 555–562.

**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЛЕЙКЕМИЯ
ИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (LIF)
С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СВИНЕЙ ***

**STUDY LINKS GENE POLYMORPHISM LEUKEMIA INHIBITORY
FACTOR (LIF) WITH THE REPRODUCTIVE
PERFORMANCE OF PIGS**

М. А. Леонова, А. Ю. Колосов, Л. В. Гетманцева

ФГБОУ ВО Донской государственный аграрный университет

M.A. Leonova, A.Yu. Kolosov, L.V. Getmanceva
Don State Agrarian University

e-mail: m.leonovaa@mail.ru

Аннотация

Полиморфизм гена LIF рассматривается как маркер воспроизводительных качеств свиней, влияющий главным образом на количество поросят при рождении и многоплодие. Целью данной работы было изучить влияние полиморфизма гена LIF, обусловленного точечной мутацией (SNP rs3463076786) в 3 экзоне на продуктивные качества свиней пород ландрас, крупная белая и дюрок. Во всех исследуемых группах были определены три генотипа по гену LIF AA, AB и BB. Установлена связь полиморфизма гена LIF с показателями репродуктивных качеств свиней. Определены аллельные варианты гена, закрепление которых в популяции будет способствовать повышению продуктивных качеств свиней.

* Работа выполнена за счет средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук - договор № 14.W01.16.7781-МК «14» марта 2016 г.

Abstract

Polymorphism LIF gene is regarded as a marker of reproductive qualities of pigs, which affects mainly the number of piglets at birth and multiple pregnancy. The aim of this work was to study the effect of LIF gene polymorphism caused by a point mutation (SNP rs3463076786) in exon 3 in the productive qualities of pigs Landrace breeds, Large White and Duroc. In all groups, all three genotype gene LIF AA, AB and BB were identified. The connection LIF gene polymorphism with indicators of reproductive qualities of pigs. Identified allelic variants of the gene, which is binding in the population will increase the productive qualities of pigs.

Уровень продовольственной безопасности страны зависит от потенциала сельскохозяйственного производства. Развитие современного животноводства невозможно без использования инновационных методов. Открытия в области молекулярной генетики позволяют выделять и изучать определенные участки генов, влияющие на формирование хозяйственно ценных признаков. Разработка современных биотехнологических методов селекции с целью создания отечественных высокопродуктивных пород с.-х. животных будет способствовать повышению рентабельности и инвестиционной привлекательности отечественного животноводства [1].

Ген лейкоemia ингибирующего фактора (LIF) представляет собой цитокин плеiotропного действия, который участвует во многих процессах, влияет на различные эндокринные ткани и типы клеток, играет важную роль в процессе эмбриогенеза [1,2]. У свиней ген LIF локализован в хромосоме 14q2.1-q2.2 в 3 экзоне [3].

Цель исследования — изучить влияние полиморфизма гена LIF, обусловленного точечной мутацией (SNP rs3463076786) в 3 экзоне на продуктивные качества свиней пород ландрас, крупная белая и дюрок. Объектом исследования служили свиньи породы ландрас ($n = 326$), крупной белой породы ($n = 135$) и породы дюрок ($n = 46$). Анализ проводили с использованием метода ПЦР-ПДРФ. По результатам генотипирования были сформированы группы животных с учетом генотипов по гену LIF (AA, AB, BB). Воспроизводительные качества оценивали по результатам первых трех опоросов.

При изучении распределения частот аллелей и генотипов по гену LIF отмечается породный аспект. У свиней породы ландрас преобладал аллель В при равном распределении частот генотипа АВ и ВВ. У свиней крупной белой породы наибольшую частоту имел гетерозиготный генотип АВ (57,8 %), частота генотипа АА имела промежуточное значение (36,3 %). В исследуемой популяции приоритетом располагал аллель А. У свиней породы дюрок, напротив, наибольшую частоту имел аллель В (76,1 %) и генотип ВВ (60,9 %). Такое распределение связано с направлением продуктивности данных пород и их специализацией.

Анализ продуктивных качеств свиней в зависимости от генотипов гена LIF показал наличие связи аллельных вариантов гена с продуктивностью. Данные представлены в таблице.

**Воспроизводительные качества свиноматок
в зависимости от генотипов гена LIF**

Генотип	n	Количество поросят при рождении, гол	Многоплодие, гол	Масса гнезда при рождении, кг
Ландрас				
АА	50	13,90 ± 0,51**	12,74 ± 0,37**	18,30 ± 1,58
АВ	70	13,23 ± 0,53	11,90 ± 0,61	17,08 ± 1,93
ВВ	90	12,51 ± 0,37	11,41 ± 0,48	16,20 ± 0,80
Крупная белая				
АА	24	12,58 ± 0,42*	11,61 ± 0,34*	16,17 ± 0,57
АВ	32	13,20 ± 0,18	11,52 ± 0,32	16,63 ± 0,48
ВВ	12	11,33 ± 0,36	10,67 ± 0,26	14,61 ± 0,93
Дюрок				
АА	4	12,14 ± 0,35***	12,14 ± 0,38***	15,52 ± 0,42***
АВ	12	11,67 ± 0,71	10,52 ± 0,56	15,33 ± 0,63
ВВ	16	10,13 ± 0,39	8,76 ± 0,28	13,25 ± 0,29

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

Полученные результаты показали статистически значимое влияние полиморфизма гена LIF на продуктивные показатели свиней. В качестве желательного генотипа во всех породах определен генотип АА/LIF, наличие которого связано с большим количеством поросят при рождении и многоплодием. Свины породы ландрас генотипа АА/

LIF превосходили аналогов BB/LIF по количеству поросят при рождении на 1,4 гол. (11 %, $p < 0,01$) и по многоплодию на 1,3 гол. (11,7 %, $p < 0,01$). Свины крупной белой породы генотипа AA/LIF превосходили аналогов BB/LIF по количеству поросят при рождении на 1,3 гол. (11 %, $p < 0,05$), по многоплодию на 0,9 гол. (8,8 %, $p < 0,05$). Свины породы дюрок генотипа AA/LIF имели лучшую продуктивность по количеству поросят при рождении на 2,0 гол. (20 %, $p < 0,001$), по многоплодию на 3,4 гол. (39 %, $p < 0,001$), а также по массе гнезда при рождении на 2,3 кг (17 %, $p < 0,001$). Генотип АВ в генетической конструкции свиней занимает промежуточные значения во всех рассматриваемых породах, что свидетельствует о концентрации желательного аллеля А, способствующего повышению плодовитости.

Таким образом, полученные результаты показали, что полиморфизм гена LIF связан с воспроизводительными показателями свиней и может быть использован в качестве ДНК-маркера плодовитости в практической селекции.

Данная работа является частью комплексного изучения свиней различных пород, целью которого является исследование генетических основ изменчивости признаков свиней путем поиска и идентификации ряда ключевых генов, вовлеченных в развитие хозяйственно ценных качеств этих животных.

Литература

1. Гетманцева Л. В., Леонова М. А., Третьякова О. Л., Усатов А. В. Взаимосвязь полиморфизма гена LIF/DraIII с продуктивными качествами свиней // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2014. № 3. С. 36–39.
2. Леонова М. А., Гетманцева Л. В., Колосов А. Ю. Распределение частот аллелей и генотипов гена лейкемия ингибирующего фактора у свиней различных пород // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2. ISSN 2070–7428, [Электронный ресурс] URL: www.science-education.ru/122-17343.
3. Leonova, M.A., L. V. Getmantseva, V.N. Vasilenko, A. I. Klimenko, A. V. Usatov, S.Yu. Bakoev, A.Yu. Kolosov, N. V. Shirockova. 2015.

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Gene Polymorphism and its Impact on Reproductive Traits of Pigs. Am. J. Anim. Vet. Sci., 10 (4): 212–216.

**GLAD-ПЦР-АНАЛИЗ ОНКОМАРКЕРОВ
МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК, АССОЦИИРОВАННЫХ
С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ***

**GLAD-PCR ASSAY OF DNA METHYLATION MARKERS
ASSOCIATED WITH COLORECTAL CANCER**

Б. С. Малышев ¹, А. А. Евдокимов ¹, Н. А. Сметанникова ¹,
М. А. Абдурашитов ¹, А. Г. Акишев ¹, В. В. Кузнецов ¹,
Е. С. Давидович ¹, В. В. Федотов ¹, А. Б. Карпов ²,
Н. А. Нетесова ¹, С. Х. Дегтярев ¹

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

² *ФГУП Северский биофизический научный центр ФМБА России*

B. S. Malyshev ¹, A. A. Evdokimov ¹, N. A. Smetannikova ¹, M. A. Abdurashitov ¹,
A. G. Akishev ¹, V. V. Kuznetsov ¹, E. S. Davidovich ¹, V. V. Fedotov ¹,
A. B. Karpov ², N. A. Netesova ¹, S. Kh. Degtyarev ¹

¹ SRC VB «Vector», Russia

² Seversk BRC FMBA, Russia

Аннотация

Колоректальный рак (КРР) является одной из наиболее опасных злокачественных онкопатологий. Для многих онкозаболеваний,

* Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению № 14.604.21.0102 от 05.08.2014 г. (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0102), заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

в том числе и КРР, отмечено гиперметилирование регуляторных участков ряда генов. На основе недавно открытой уникальной метил-зависимой сайт-специфической ДНК эндонуклеазы *GlaI*, нами был разработан метод GLAD-ПЦР, позволяющий быстро и недорого определять местоположение 5'-R(5mC)GY-3' сайтов в конкретных участках генома человека, без использования метода бисульфитной конверсии.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the major malignancies worldwide. Hypermethylation of the gene regulatory regions is shown for many cancer diseases including CRC. On the basis of recently discovered unique methyl-directed site-specific DNA endonuclease *GlaI* we developed a GLAD-PCR assay allowing quick and inexpensive estimation of 5'-R(5mC)GY-3' site in a definite position of human genome without bisulfite conversion.

Аберрантное метилирование регуляторных областей генов-онкомаркеров показано для большинства ненаследственных (спорадических) форм рака, которые в среднем составляют более 90 % всех случаев злокачественных новообразований. Аберрантным (аномальным) считается локальное гиперметилирование отдельных участков ДНК, так называемых CpG-островков, в регуляторных областях генов-онкосупрессоров, которые в норме лишены метильных групп. В раковых клетках гиперметилирование *de novo* происходит благодаря активности ДНК метилтрансфераз (МТаз) *Dnmt3a* и *Dnmt3b*. Данные МТазы распознают и метилируют последовательность RCGY, превращая ее в последовательность R(5mC)GY [1–3]. ДНК эндонуклеаза *GlaI*, в свою очередь, способна распознавать только метилированные сайты R(5mC)GY, на основании чего был разработан метод GLAD-ПЦР [Патент РФ № 2525710]. Определение метилированных участков происходит последовательно в три этапа: гидролиз, лигирование, ПЦР. Гидролиз образца ДНК метил-зависимой эндонуклеазой *GlaI* по специфическому сайту R(5mC)GY, позволяет фиксировать наличие метилирования в анализируемых участках. Лигирование адаптера (специально подобранного

универсального олигонуклеотидного дуплекса) — промежуточный шаг закрепляющий точку расщепления ДНК для проведения дальнейшего ПЦР. Амплификация метилированной ДНК происходит с помощью гибридного праймера, частично комплементарного последовательности пришитого адаптера, с одной стороны, и второго праймера соответствующего участку геномной последовательности с другой. Специфическая ПЦР, в таких условиях, может происходить только при успешном прохождении первых двух стадий, что в свою очередь возможно только при наличии метилирования в исходном анализируемом участке выбранного гена. ПЦР в режиме реального времени с использованием флюоресцентно-меченого Taqman-зонда устраняет необходимость проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации, а кроме того дает возможность количественной оценки метилированных молекул ДНК при сравнении с контрольными образцами.

В работе исследованы участки 23 генов-онкомаркеров ассоциированных с КРР. Метилированные сайты RCGY были определены на модели клеточной линии SW837 колоректальной аденокарциномы. Всего исследовано 26 участков, 23 из которых отобраны для дальнейшей работы. ДНК выделенное из образцов донорских тканей колоректальной аденокарциномы и образцов нормальных тканей слизистой прямой кишки, в количестве 21 и 9 соответственно, были проанализированы методом GLAD-ПЦР. В целом, данные полученные для донорских образцов подтвердили, преобладание гиперметилированных сайтов RCGY во всех исследуемых генах онкологических образцов. Образцы здоровой ткани показали полное отсутствие метилирования для генов *SDC2*, *FBN1(3.3)*, *FBN1(3.1)*, *SEPT9*, *THBD* и *VIM*. Однако в случае с генами *EID3* и *ESR1* было обнаружено, что часть образцов здоровых тканей все же была метилирована, а для генов *TMEFF2* и *SOX17* в норме оказались метилированы все 9 образцов.

Для более точного определения эффективности генов-онкомаркеров мы провели статистический ROC-анализ полученных данных. Интегральным показателем которого служит площадь под ROC-кривой (ППК), определяемая чувствительностью и специфич-

ностью теста. Эффективность генов-онкомаркеров с ППК > 0.8 распределится следующим образом:

$$FBNI(3.3) > FBNI(3.1) = CNRIP1 > ADHFE1 > FBNI(2) > FBNI(1) > SDC2 > UCHL1 > SEPT9 = VIM > THBD > SOCS3.$$

Представленный нами вариант эпигенетической диагностики методом GLAD-ПЦР, позволяет идентифицировать гиперметилированные участки уже на ранних стадиях возникновения нарушений функциональной активности генов. В работе показана эффективность метода при анализе метилирования генов-онкомаркеров колоректального рака в образцах биологического материала. В дальнейшем, полученные результаты могут быть использованы в молекулярно-генетической диагностике других онкозаболеваний, а также для оценки эффективности противораковой терапии.

Литература

1. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer // Nat Rev Cancer. 2009. V. 9. P. 489–499.
2. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. [под ред. М. А. Пальцева и Д. В. Залетаева]. М.: изд-во «Медицина», 2009.
3. Jorda M, Peinado MA. Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer // Mutat Res. 2010. V. 693. P. 84–93.

**МОНИТОРИНГ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАРДИАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ В ЗОНУ
ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ МИОКАРДА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ
РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ**

**BIOLUMINESCENT MONITORING
OF RAT CARDIAC STROMAL CELLS
IN PLATELET GEL ENGRAFTMENT IN ISCEMIC HEART**

Е. А. Милевская ^{1,2,3}, Е. В. Чепелева ², С. В. Павлова ^{1,2},
Д. С. Сергеевичев ², С. М. Закиян ^{1,2}

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН*

² *ННИИПК им. акад. Е. Н. Мешалкина*

³ *Новосибирский государственный университет*

E.A. Milevskaya ^{1,2,3}, E. V. Chepeleva ², S. V. Pavlova ^{1,2},
D. S. Sergeevichev², S. M. Zakiyan ^{1,2}

¹ The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics,
The Siberian Branch of Russian Federation Academy of Sciences

² Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research
Institute of Circulation Pathology, Ministry
of Health Care of Russian Federation

³ Novosibirsk National Research State University

e-mail: milevskayaliza@gmail.com

Аннотация

Использование кардиальных стромальных клеток — перспективное направление в терапии ишемического поражения миокарда. Успех клеточной терапии зависит от эффективности доставки целевых клеток и их приживления в пораженной зоне. Для мониторинга хоуминга трансплантированных клеток был выбран метод

биолюминесценции. Показана линейная зависимость активности люциферазы от количества клеток, что позволило провести количественную оценку эффективности трансплантации и приживления кардиальных стромальных клеток. Проведено сравнение различных способов интрамиокардиальной трансплантации клеток. Клетки, трансплантированные в составе фибринового геля, сохраняются до 14 дней.

Abstract

The use of cardiac stromal cell culture is one of promising directions of ischemic heart injury treatment. Success of cell therapy depends of efficiency of cell delivery and homing to injury area. A bioluminescence method was chosen to monitor homing of transplanted cells. A linear correlation between luciferase activity and cell number was shown. This fact allowed to assess cardiac stromal cells transplantation and homing efficiency quantitatively. Different ways of intramyocardial transplantation were compared. Cells transplanted in fibrin gel stay viable up to 14 days.

Применение клеточных технологий в терапии последствий ишемического поражения миокарда является развивающимся направлением современной медицины. Ключевым моментом успеха любой клеточной терапии является высокая эффективность доставки целевых клеток и их приживление в целевой зоне.

В данной работе мы оценили эффективность приживления кардиальных стромальных клеток (КСК) после трансплантации в зону ишемизированного миокарда крыс после окклюзии передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. КСК характеризуются наличием маркеров стромальных клеток CD105, CD90, CD73, CD29 и активно пролиферирующих клеток CD117 (c-kit). Также при характеристике КСК выявляются черты, присущие эндотелиальным клеткам — экспрессия фактора вон Виллебранда (vW), производство белков экстраклеточного матрикса (фибронектина, коллагенов I и IV типа), сродство к изолектину B4, формирование капилляроподобной структуры в тесте на матригеле. Трансплантацию клеток в миокард проводили в культуральной среде (группа I) и в

фибриновом матриксе (группа II) для улучшения фиксации клеток в ткани. Клетки (КСК-Luc) были модифицированы трансдукцией лентивирусной конструкции pLentiPGK V5-LUC Neo, несущей ген фермента люциферазы. Проведена селекция меченых клеток с помощью антибиотика G418. Активность люциферазы в клеточных экстрактах регистрировали на приборе WALLAC 1420 MULTILABEL COUNTER.

Была подтверждена линейная зависимость активности люциферазы в экстрактах клеток от их количества, что позволило провести количественную оценку эффективности трансплантации и приживления КСК-Luc. Было показано, что в первые 48 часов после трансплантации КСК-Luc в обеих группах пролиферируют, но клетки, в составе тромбинового матрикса делают это более интенсивно ($168,00 \pm 8,43$ % относительно исходного количества) по сравнению со «свободными» клетками ($119,75 \pm 11,67$). Дальнейшее наблюдение показало, что в обеих группах животных происходило снижение количества КСК-Luc в миокарде. На 14 день наблюдения количество КСК-Luc, трансплантированных в фибриновом матриксе, составляло менее 2 % от исходного. В миокарде крыс I группы трансплантированные клетки в количестве 2 % выявлялись на сроке наблюдения 10 дней. Известно, что трансплантация стромальных клеток мезенхимального происхождения оказывает значительный терапевтический эффект за счет паракринных факторов. Таким образом, пролонгированность пребывания трансплантированных КСК, обеспеченное фибриновым матриксом, будет способствовать более длительному воздействию паракринных факторов на ремоделирование миокарда после ишемического поражения в т.ч. усилению ангиогенеза и уменьшению фиброза.

**ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ P17 И P54
ВИРУСА АЧС В КЛЕТКАХ COS-1 И HEK-293**

**EXPRESSION OF PROTEINS P17 AND P54 OF ASF VIRUS
IN CELLS CULTURE COS-1 И HEK-293T/17**

К. А. Мима, Г. С. Бурмакина, И. А. Титов, А. С. Малоголовкин

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии
Российской академии сельскохозяйственных наук*

K.A. Mima, G.S. Burmakina I.A. Titov, A.S. Malogolovkin
National Research Institute for
Veterinary Virology and Microbiology of Russia

e-mail: mima89@ya.ru

Аннотация

В тезисе представлены результаты получения иммунодоминантных белков p17 и p54 вируса АЧС в клетках млекопитающих COS-1 и HEK-293T/17. Для получения рекомбинантных белков был использован вектор pEGFP-N1 с цитомегаловирусным промотором и маркерным белком EGFP. Уровень экспрессии и локализация проанализированы посредством флуоресцентной микроскопии маркерного белка EGFP, «сшитого» с белками p17 и p54. Методом иммуноблота оценена возможность использования рекомбинантных белков в иммунологических реакциях. В ходе исследований определена цитоплазматическая локализация белков p17 (D117L) и p54 (E183L). Полученные белки могут специфически взаимодействовать с антителами к вирусу АЧС и могут быть использованы в иммунологических реакциях.

Abstract

Here, we present the results of obtaining immunodominant proteins p17 and p54 of ASF virus in mammalian cells COS-1 and

HEK-293T/17. pEGFP-N1 vector with CMV promoter and marker protein EGFP was used to produce recombinant proteins. Localization and level of expression were analyzed by fluorescence microscopy of EGFP protein marker, fused with proteins p17 and p54. Western blot was used for assessment recombinant proteins in immunological reactions. The studies determined the cytoplasmic localization of proteins p17 (D117L) and p54 (E183L). The obtained proteins can specifically interact with the virus-specific antibodies and can be used in immunological reactions as antigen.

Африканская чума свиней (АЧС) является высоко контагиозной болезнью свиней, вызывающей серьезные экономические потери по всему миру. Основными мерами борьбы против АЧС является только своевременная диагностика, карантин и уничтожение всех свиней в пораженной зоне. Трудность борьбы с АЧС делает необходимым совершенствование противоэпизоотических мероприятий на основе новейших научных достижений. Экспрессия структурных белков вируса АЧС в эукариотических клетках поможет лучше понять патогенез заболевания и изучить локализацию вирусных белков в клетках хозяина, а так же позволит использовать их в качестве антигена в иммунологических реакциях. Особый интерес представляют иммунодоминантные белки вируса p17 (D117L) и p54 (E183L) вируса АЧС. p17 является высоко иммуногенным структурным белком вируса АЧС и экспрессируется на поздней стадии репликации вируса. Белок p54, кодируемый геном E183L, также является поздним структурным белком. Оба белка представляют интерес, так как играют важную роль в поддержании жизнеспособности вируса и иммунологическом ответе хозяина.

Для получения рекомбинантных конструкций в составе экспрессирующего вектора pEGFP-N1 с цитомегаловирусным промотором и маркерным белком EGFP использовали специфические олигонуклеотидные праймеры, содержащие сайты рестрикции BamHI и AgeI для белка p17 и сайты SacI, EcoRI для белка p54. Доставку рекомбинантных плазмид в перевиваемые линии клеток COS-1 и HEK-293T/17 осуществляли посредством липофектамина, согласно инструкции производителя. Уровень экспрессии и локализацию рекомбинантных

белков оценивали по флуоресценции репортерного белка EGFP и при помощи окраски ядер клеток DAPI субстратом. Анализ рекомбинантных белков проводили методом иммуноблотинга.

Методом рестрикции и ПЦР было подтверждено наличие специфической вставки генов D117L (P17) и E183L (P54) в рекомбинантной плазмиде. Правильность рамки считывания проверена секвенированием с праймерами на тело плазмиды.

Результаты электрофореза в агарозном геле рекомбинантных плазмид после рестрикции показали фрагменты ДНК ожидаемой длины (354 bp для белка P17 и 555 bp для белка p54). Результаты флуоресцентной микроскопии показали, что экспрессия белков начинается на 6–7 час после трансфекции клеточной культуры и увеличивается до 24 часа после трансфекции, далее ее уровень не изменяется. Так же, удалось выяснить, что оба белка являются цитоплазматическими и отличаются по характеру распределения в цитоплазме. Белок p17 расположен в цитоплазме в виде мелких включений, а белок p54 равномерно распределен по всей цитоплазме клетки.

Данные иммуноблота с лизатом трансфицированных клеток COS-1 и НЕК-293Т/17 позволяют выявлять специфические белковые полосы с молекулярной массой в 40 кДа, что соответствует расчетной массе белка P54 и в 80 кДа, что превышает расчетную молекулярную массу белка P17 в два раза.

Таким образом, удалось установить, что экспрессия обоих рекомбинантных белков достигает максимума на 24 час после трансфекции и что оба они локализуются в цитоплазме клеток, в составе клеточной мембраны и различаются характером распределения. По результатам иммуноблота подтверждена возможность использования после дополнительной очистки рекомбинантного белка P54 в иммунологических реакциях в качестве антигена и обоснована необходимость дополнительного изучения белка p17.

**ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИНТЕГРИРОВАННОГО
БИОИНСЕКТИЦИДА ДЛЯ БОРЬБЫ С НЕПАРНЫМ
ШЕЛКОПРЯДОМ (*LYMANTRIA DISPAR* L.)**

**STUDY OF SYNERGISTIC EFFECT WITH USING
THE INTEGRATED BIOINSECTICIDE TO CONTROL GYPSY
MOTH (*LYMANTRIA DISPAR* L.)**

A. A. Моисеева, О. В. Охлопкова, А. В. Колосов

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Россия*

A.A. Moiseeva, O.V. Okhlopkova, A.V. Kolosov
SRC VB «Vector», Koltsovo, Russia

Аннотация

Необходимость в регуляции численности насекомых-вредителей с каждым годом увеличивается в сельском и лесном хозяйствах. Важно внедрять новые экологически безопасные методы контроля вредителей. Наиболее перспективными среди агентов биологической борьбы являются биопрепараты на основе вирусных и бактериальных агентов, так как они имеют высокую специфичность к конкретному вредителю и не оказывают воздействия на другие компоненты биоценоза.

Abstract

The need to regulate the pest population is increasing every year in agriculture and forestry. It is important to introduce the new environmentally safe method to control insect pests. Biological products based on viral and bacterial agents are the most advanced biological control agents because they are specific to target pests and harmless to other components of the ecological community.

Актуальность

Фактором, определяющим биологическую эффективность бактериальных биопрепаратов для контроля численности насекомых, является высокая скорость воздействия на вредителей. Тем не менее, асинхронность индивидуального развития насекомых создает значительные проблемы при использовании бактериальных инсектицидов. Необходимо оптимизировать состав биопрепаратов для повышения эффективности и уменьшения экономических затрат. Для этого предлагается создать комплексные средства защиты растений, основанные на эффекте синергизма бактериальных и вирусных агентов.

Цель

Цель исследования — изучить возможность проявления синергетического эффекта от совместного применения биопрепарата «Лепидоцид» и изолята вируса ядерного полиэдроза (ВЯП НШ) против непарного шелкопряда.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили инфекционные агенты — изолят ВЯП НШ (ГНЦ ВБ «Вектор»), биопрепарат «Лепидоцид» на основе *Bacillus thuringiensis* (ООО ПО «Сиббиофарм»). В качестве индикатора эффективности использовалась популяция гусениц непарного шелкопряда 3 возраста. Применялась методика лабораторного культивирования гусениц при алиментарном способе заражения, наличие действующих агентов в погибших гусеницах определялась микроскопическим методом.

Рассчитывались показатели эффективности — ЛВ50 (летальное время (в сутках), за которое погибает 50 % гусениц) и общая гибель гусениц (в процентах) при заражении исследуемыми инфекционными агентами разных концентраций.

Результаты

Таблица 1

**Эффективность «Лепидоцида», изолята ВЯП НШ
и смеси по показателю ЛВ50 (в сутках)**

Лепидоцид (С)¹	0 (к-ль)	6×10^9	6×10^8	6×10^7	6×10^6
ВЯП НШ (С)²					
0 (к-ль)	> 25	$1,7 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,6$	$16,9 \pm 1,5$
10^8	$8,8 \pm 0,7$	— ³	—	—	—
10^7	$9,5 \pm 0,1$	—	—	—	—
10^6	$10,3 \pm 0,9$	—	—	$1,5 \pm 0,2$	$12,4 \pm 2,0$

¹ Концентрация Лепидоцида указана в количестве спор в 1 мл.

² Концентрация ВЯП НШ указана в количестве полиэдров в 1 мл.

³ Данные смеси не тестировались.

Из таблицы 1 видно, ЛВ50 при заражении вирусом ядерного полиэдроза непарного шелкопряда с концентрацией 10^6 пэ/мл составило 10,3 суток, с концентрацией 10^7 пэ/мл — 9,5 суток, с концентрацией 10^8 пэ/мл — 8,8 суток. Для «Лепидоцида» данный показатель составил при заражении концентрацией 6×10^9 спор/мл ЛВ50 = 1,7 суток, с концентрацией 6×10^8 спор/мл — 2,4 суток, с концентрацией 6×10^7 спор/мл — 2,7 суток, с концентрацией 6×10^6 спор/мл — 16,9 суток.

Таблица 2

**Эффективность «Лепидоцида», изолята ВЯП НШ
и смеси по показателю общей гибели (в процентах (%))**

Лепидоцид (С)¹	0 (к-ль)	6×10^9	6×10^8	6×10^7	6×10^6
ВЯП НШ (С)²					
0 (к-ль)	≤ 5	94 ± 3	98 ± 7	89 ± 7	33 ± 1
10^8	90 ± 5	— ³	-	-	-
10^7	78 ± 1	-	-	-	-
10^6	63 ± 9	-	-	95 ± 3	55 ± 6

¹ Концентрация Лепидоцида указана в количестве спор в 1 мл.

² Концентрация ВЯП НШ указана в количестве полиэдров в 1 мл.

³ Данные смеси не тестировались.

Из таблицы 2 видно, что показатель общей гибели примерно одинаков для самой высокой концентрации «Лепидоцида» 6×10^9 спор/мл и для смеси со значительно меньшей концентрацией «Лепидоцида» и добавлением изолята вируса ядерного полиэдроса и составляет 94–95 %.

Выводы

В результате исследования было установлено, что при совместном применении биопрепарата «Лепидоцид» и изолята ВЯП НШ проявляется эффект синергизма и пролонгированное действие смеси при определенных концентрациях инфекционных агентов.

АНТИТЕЛА-ПРОТЕАЗЫ — НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХАРАКТЕРА ТЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ *

ANTIBODIES-PROTEASES — NEW DIAGNOSTIC MARKERS OF HIV-INFECTION NATURE

Е. С. Одинцова, С. В. Баранова, В. Н. Бунева, Г. А. Невинский

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

E. S. Odintsova, S. V. Baranova, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
Novosibirsk, Russia

e-mail: swb@niboch.nsc.ru

Аннотация

Актуальной задачей современной медицины является поиск новых маркеров вирусных и аутоиммунных патологий. Данное направление

* Работа поддержана грантом Президента для молодых кандидатов наук № 14.W01.16.6187-МК, а также грантами РФФИ №№ 15-04-03245, 16-34-00079, 16-04-00604.

исследований необходимо для разработки новых подходов диагностики и персонализированной медицины этих патологий. В настоящей работе изучена корреляция клинических симптомов ВИЧ-инфекции и аутоиммунных патологий с содержанием в крови пациентов антител против различных антигенов, а также каталитически активных антител.

Abstract

The development of new markers of viral and autoimmune pathologies is an important problem of modern medicine. This direction of research is important for both diagnosis and personalized therapy of these diseases. In this work we investigated the correlation of clinical symptoms of HIV-infection and some autoimmune pathology with the content of antibodies against various antigens of infectious agents as well as catalytically active antibodies in the blood of patients.

В настоящее время для дифференциальной диагностики на наличие вируса иммунодефицита в крови, а также контроля состояния больного используют иммуноферментный анализ и вестерн-блот, ПЦР с обратной транскрипцией и проточную цитометрию. Стадию ВИЧ-инфекции также определяют по сопутствующим заболеваниям, развивающимся вследствие иммунодефицита. Перечисленные подходы не позволяют прогнозировать характер течения заболевания и переход заболевания на следующую стадию. Такой прогноз позволил бы заблаговременно изменить терапию пациента и в перспективе улучшить состояние. Согласно опубликованным данным, ВИЧ-инфекция не только сопровождается иммунным ответом на компоненты вируса, но и приводит к сбою иммунной системы, ведущему к развитию аутоиммунных патологий. Ранее нами детально исследованы антитела крови ВИЧ-инфицированных больных, расщепляющие ДНК и белки, и получены данные, указывающие на связь этих активностей со скоростью перехода заболевания на следующую стадию.

Мимикрия ряда белков человека и некоторых вирусов является одним из факторов сбоя иммунной системы человека. В подобных

случаях в организме сначала нарабатываются антитела против вирусных белков, а затем иммунная система перестает различать чужеродные и собственные белки. Согласно литературным данным, в крови больных с ВИЧ-инфекцией может повышаться концентрация гистонов. Не исключено, что наработка каталитически активных антител, абзимов против гистонов может привести к сбою иммунной системы, ведущей к последующей наработке абзимов и против основного белка миелина. Такие процессы могут стимулировать развитие нервных и психических расстройств, которые наблюдаются у ВИЧ-инфицированных больных.

В крови ВИЧ-инфицированных пациентов нами ранее обнаружены каталитически активные антитела, гидролизующие ДНК, белки ВИЧ (интегразу и обратную транскриптазу) и некоторые белки человека (сывороточный альбумин и казеин).

Цель настоящей работы — детальное изучение каталитических свойств антител-протеаз, гидролизующих гистоны при ВИЧ-инфекции, сравнение их со свойствами ферментов. Полученные данные необходимы для установления механизмов наработки и возможной биологической роли таких антител при ВИЧ-инфекции. Кроме того, протеазная активность может служить дополнительным критерием, отражающим состояние ВИЧ-инфицированного пациента. Это позволит сделать прогноз о скорости развития заболевания, а также индивидуально подобрать терапию.

Иммуноферментным анализом обнаружено, что сыворотки ВИЧ-инфицированных больных и здоровых доноров содержат аутоантитела против гистонов. Показано, что электрофоретически и иммунологически гомогенные IgG, выделенные из сыворотки ВИЧ-инфицированных пациентов эффективно гидролизуют от одного до пяти человеческих гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4). На основании общепринятых критериев показано, что гистон-гидролизующая активность антител из крови ВИЧ-инфицированных больных является их собственным свойством. Относительная эффективность гидролиза гистонов значительно варьировалась для IgG различных пациентов. Установлено, что суммарный пул антител крови ВИЧ-инфицированных больных, так же как и в случае

абзимов крови больных с различными аутоиммунными заболеваниями, содержит абзимы с активными центрами подобными сериновым и металлопротеазам. Кроме того было выявлено значительное ингибирование активности йодацетомидом, что указывает на наличие в суммарном пуле антител тиоловых-протеаз. Изучение каталитических свойств антител (сродство к гистонам, металл- и рН-зависимость, субстратная специфичность) показало, что ферментативные характеристики абзимов различны для каждого пациента и зависят от стадии и особенностей течения заболевания. Так как IgG могут эффективно гидролизовать гистоны, нельзя исключить их негативную роль в развитии синдрома приобретенного иммунодефицита.

Полученные данные могут позволить выработать новые стандарты персонализированной терапии заболевания. Разработка новых методов диагностики состояния больного, эффективности терапии, а также прогнозирования характера течения заболевания поможет найти оптимальное лечение, а также улучшить качество жизни больного.

**РАЗРАБОТКА ВЫСОКОАКТИВНОГО
ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА АНТИБИОТИКА
ЭРЕМОМИЦИНА МЕТОДОМ ИНДУЦИРОВАННОГО
НЕНАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА**

**DEVELOPMENT OF A HIGH-YIELD EREMOMYCIN-
PRODUCING STRAIN BY A MULTI-STEP RANDOM
MUTAGENESIS**

Е. Д. Попова ¹, В. И. Глаголев ², В. А. Савушкин ³,
А. И. Овчинников ¹, В. В. Джавахия ¹

¹ *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии наук*

² *Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия*

³ *Российский государственный аграрный университет —
МСХА имени К. А. Тимирязева*

E. D. Popova ¹, V. I. Glagolev ², V. A. Savushkin ³,
A. I. Ovchinnikov ¹, V. V. Dzhavakhiya ¹

¹ *Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology»,
Russian Academy of Sciences*

² *Mendeleev University of Chemical Technology of Russia,
Moscow, Russia*

³ *Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev
Agricultural Academy*

Аннотация

Антибиотик эремомицин относится к группе циклических гликопептидов. Он был выделен из почвы и охарактеризован сотрудниками ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН (ГУ НИИНА им. Г. Ф. Гаузе РАМН). Эремомицин является структурным аналогом антибиотика ванкомицина, широко применяемого

в клинической практике с 1958 года для лечения стафилококковых инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами золотистого стафилококка (MRSA), устойчивыми к другим препаратам.

В результате проведения многоступенчатого индуцированного УФ-мутагенеза штамма *Amycolatopsis orientalis* VKM Ac-2717D, в комбинации с селекцией высокопродуктивных изолятов, был получен новый штамм E 11–8 — суперпродуцент эремомицина с продуктивностью 2.5 ± 0.3 г/л антибиотика в культуральной жидкости.

Abstract

Eremomycin antibiotic belongs to cyclic glycopeptides. It was isolated from the soil and characterized by researchers of the Gauze Institute of New Antibiotics (Russian Academy of Medical Sciences). Eremomycin is a structural analogue of vancomycin, which is widely used in a clinical practice since 1958 for the treatment of staphylococcoses caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) resistant to other drugs.

The performed multi-step induced UV mutagenesis of *Amycolatopsis orientalis* VKM Ac-2717D combined with the selection of highly productive mutants resulted in a new E 11–8 strain, which productivity reached 2.5 ± 0.3 g/L.

Одним из основных способов получения новых штаммов, обладающих ценными промышленными свойствами, в течение многих лет остается мутагенез, индуцируемый физическими, химическими или биологическими факторами или их комбинацией и обладающий рядом преимуществ по сравнению с другими способами, такими как скрининг природных штаммов или геновая модификация. Целью данного исследования являлось получение нового высокоактивного штамма *A. orientalis* с помощью многоступенчатого УФ-мутагенеза с последующей селекцией наиболее продуктивных изолятов для достижения максимально высокой концентрации антибиотика эремомицина в культуральной жидкости (КЖ).

В качестве исходного штамма использовали штамм *A. orientalis* VKM Ac-2717D продуктивностью 1.2 г/л. Мицелий 4–6-дневной культуры смывали с поверхности агаризованной среды стерильной

водой и фильтровали через ватный фильтр для отделения крупных конгломератов мицелия. Затем суспензию фильтровали через стеклянный фильтр (размер пор — 100 мкм) для получения равномерной суспензии мелких фрагментов мицелия и обрабатывали на ультразвуковой бане в течение 30 минут, после чего облучали коротковолновой (100–280 нм) ультрафиолетовой лампой Short Wave Ultra-violet Mineralight (США) мощностью 12.5 Вт. Расстояние от источника облучения до обрабатываемой суспензии составляло 40 см. После облучения 0.1 мл суспензии высевали на поверхность агаризованной среды на каждую чашку Петри и инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение 7–10 дней.

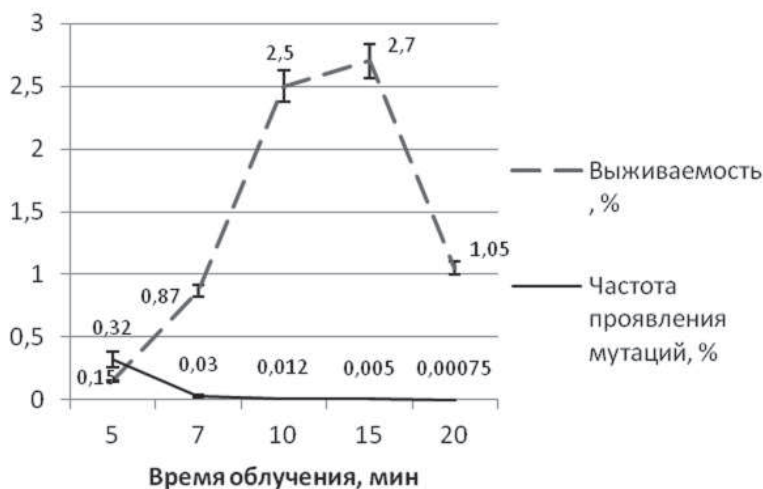
На первом этапе были построены кривые выживаемости колоний исходной культуры *A. orientalis* в зависимости от времени облучения, а также определена зависимость частоты возникновения морфологических мутаций от продолжительности облучения. С учетом этих данных было определено оптимальное время облучения, дающее максимальное число морфологически измененных изолятов, и, в то же время, обеспечивающее определенную степень выживаемости колоний. Степень выживаемости колоний определяли по соотношению выросших колоний в облученных и контрольных чашках. Колонии с измененной морфологией отбирали и пересеивали на свежую агаризованную среду для дальнейшего культивирования в ферментативной среде и определения количественного содержания эремомицина в культуральной жидкости (КЖ) с последующим отбором наиболее продуктивных изолятов.

Зависимость степени выживаемости от времени УФ-облучения показана на рисунке. Частота возникновения морфологических мутантов является косвенным признаком эффективности УФ-мутагенеза, что, в свою очередь, может коррелировать с появлением колоний с повышенной продуктивностью. Максимальный уровень возникновения мутантов наблюдали при продолжительности облучения 10–15 мин; были отмечены как колонии с измененной морфологией и пигментацией мицелия, так и колонии, отличающиеся замедленным ростом.

Исходя из полученных данных, для отбора морфологически измененных колоний в основном использовали экспозиции 10 и 15 мин.

Количество морфологически измененных изолятов при этом составляло 2–3 %.

Для определения возможной взаимосвязи между морфологическими характеристиками и повышенной продуктивностью колоний, все типы возникающих морфологических форм были протестированы на уровень биосинтеза эремомицина при глубинном культивировании.



Выживаемость и частота проявления мутаций штамма *A. orientalis* VKM Ac-2717D в зависимости от продолжительности УФ-облучения

В ходе тестирования было обнаружено, что колонии со слабо развитым воздушным мицелием и со слабой пигментацией обладали способностью к повышенному уровню биосинтеза эремомицина. Штаммы с повышенным уровнем биосинтеза отбирали для дальнейших циклов УФ-мутагенеза.

В результате ряда последовательных циклов мутагенеза с последующим скринингом колоний был получен высокоактивный штамм Е 11–8, характеризующийся повышенной продуктивностью эремомицина в ферментационной среде (2.5 ± 0.3 г/л).

УНИВЕРСАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛКОВОГО И НУКЛЕИНОВОГО СОСТАВА

UNIVERSAL TECHNOLOGY OF EXOSOMES ISOLATION SUITABLE FOR PROTEOMIC AND NUCLEIC ACID ANALYSIS

Л. В. Пурвинш¹, С. Е. Седых^{1,2},
Н. А. Стрельникова², Г. А. Невинский^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет

² Институт химической биологии
фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

L. V. Purvinsh¹, S. E. Sedykh^{1,2}, N. A. Strelnikova², G. A. Nevinsky^{1,2}

¹ Novosibirsk State University, Russia

² SB RAS ICBFM, Russia

e-mail: ladapurvinsh13@gmail.com

Аннотация

Экзосомы — везикулярные структуры, выделяемые клетками в окружающую среду. Экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации, участвуют в регуляции иммунных реакций. Показано, что изучение белков и нуклеиновых кислот экзосом имеет большой диагностический потенциал, активно исследуется возможность использования экзосом для специфической доставки лекарственных препаратов. Согласно нашим данным, протокол выделения экзосом оказывает значительное влияние на чистоту получаемых препаратов.

Abstract

Exosomes are defined as vesicular structures, secreted by different types of cells in their environment. Exosomes are considered to be of the great importance in intercellular communication, involved in the regulation of immune responses. The study of exosomal pro-

teins and nucleic acids has great diagnostic potential; also exosomes may be an elegant solution to the specific drug delivery problem. According to our data the protocol of exosomes isolation has a significant impact on the purity of obtained preparations.

Изучение белков и нуклеиновых кислот (в том числе, микроРНК) природных экзосом является важной фундаментальной задачей, ввиду того что экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации, участвуют в регуляции иммунных реакций. Показано, что белки и нуклеиновые кислоты экзосом имеют огромный диагностический и терапевтический потенциал. В связи с этим, важной и актуальной задачей является разработка нового эффективного метода получения чистых препаратов экзосом, пригодного для выделения из различных биологических жидкостей, в том числе, молока и различных тканей, выделение из которых классическими подходами затруднено.

На данный момент основным методом выделения экзосомальных структур является ультрацентрифугирование образцов, в результате которого происходит осаждение экзосом. Этот метод пригоден для выделения достаточно чистых препаратов экзосом из таких биологических жидкостями, как кровь, моча и культуральная жидкость. Нами разработан способ получения чистых препаратов экзосом из сложных биологических жидкостей, содержащих большое количество белковых примесей, например, из молока. Мы провели сравнение нескольких методик выделения, и предложили оригинальную модификацию стандартного протокола выделения экзосом. В качестве дополнительного этапа очистки препаратов экзосом предложена гель-фильтрация. Сравнение различных методик выделения экзосом было показано, что наиболее эффективным подходом является комбинация ультрафильтрации, ультрацентрифугирования и гель-фильтрации, в процессе которой происходит отделение везикулярных структур от белковых примесей.

Наличие в препаратах везикулярных структур, морфологически соответствующих экзосомам, подтверждали с помощью просвечивающей электронной микроскопии, а также иммуноцитохимическим

анализом по наличию маркерных белков CD63 и CD81 на поверхности экзосом.

Белковый состав полученных препаратов анализировали разделением белков электрофорезом в двух направлениях с последующим трипсинолизом и масс-спектрометрическим анализом, при этом количество мажорных белков в препаратах значительно различалось в зависимости от способа получения препарата, препараты после гель-фильтрации содержали значительно меньшее число примесных белков.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ (*RHODIOLA ROSEA L.*) В КАЗАХСТАНЕ

BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR CONSERVATION RHODIOLA ROSEA (*RHODIOLA ROSEA L.*) IN KAZAKHSTAN

О. Б. Райзер, О. Н. Хапилина

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК

O. B. Raiser, O. N. Khapilina

RSE «National center for biotechnology», Kazakhstan

Аннотация

В Казахстане проводятся исследования по разработке технологии микроклонального размножения родиолы розовой с целью создания промышленных плантаций в местах ее произрастания (Восточно-Казахстанская область). Произведен сбор материала родиолы розовой из 3 популяций, расположенных в субальпийском и альпийском поясах на территории Казахстанского Алтая (Западный и Южный Алтай). Для введения в культуру *in vitro* было отработано несколько протоколов стерилизации, питательных сред для индукции каллусоо-

бразования и органогенеза. Микроклональное размножение родиолы розовой осуществляли путем индукции адвентивного органогенеза из апикальных меристем стерильных проростков. Определены оптимальные концентрации экзогенных фитогормонов для элонгации микроклоновых побегов родиолы и условия их успешного укоренения в почвогрунте.

Abstract

In Kazakhstan has conducted research on development of technologies for micropropagation of *Rhodiola rosea* to create the industrial plantations in the places of its growth (East Kazakhstan region). Material from 3 populations *Rhodiola rosea* L. located in the sub-alpine and Alpine zones on the territory of Kazakhstan Altai (Western and southern Altai) collected. For introduction to in vitro culture developed several protocols of sterilization, culture media for induction of callus and organogenesis. Micropropagation of *Rhodiola rosea* L. carried out by induction of adventitious organogenesis from apical meristems of sterile seedlings. The optimal concentration of exogenous phytohormones for elongation microclonal shoots of *Rhodiola* and the conditions for their successful rooting in soils defined.

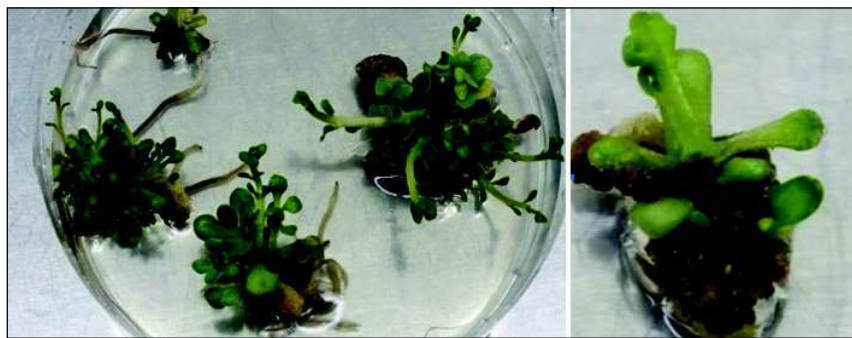
Вопросы сохранения и воспроизводства биологического разнообразия являются весьма актуальным направлением исследований. Особенно это важно для видов, которые находятся под угрозой исчезновения. Методы культуры *in vitro* ценных лекарственных растений позволяют получать экологически чистое сырье круглый год, при этом сохраняя естественные популяции в природе. Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L., семейство *Crassulaceae*) является ценным лекарственным растением, в последнее время находятся под угрозой исчезновения в виду особой популярности данного вида растений среди населения. Использование методов биотехнологии открывает перспективы для массового воспроизводства и сохранения ценного генофонда родиолы с помощью микроклонального размножения, которое является одним из альтернативных источников получения лекарственного сырья, при этом способствует сохранению природных популяций.

В Республике Казахстан проводятся исследования по разработке технологии микрোকлонального размножения родиолы розовой с целью создания промышленных плантаций в местах ее произрастания (Восточно-Казахстанская область). Были проведены скрининговые исследования по выявлению популяций родиолы розовой, расположенных на территории казахстанского Алтая. На хребтах Казахстанского Алтая в зависимости от местообитаний и увлажнения почвы было выделено 8 групп ценопопуляций родиолы розовой, различающихся по степени проективного покрытия, структуре и численности особей, формирующих данные популяции. Для введения в культуру *in vitro* был произведен сбор растений из природных популяций родиолы розовой, расположенных на территории казахстанского Алтая. Для этого было проведено 2 экспедиционных выезда на Западный Алтай (протяженность маршрута 250 км) — для обследования популяций и сбора материала живых растений родиолы розовой на хр. Ивановский (ур. Серый Луг и вершина Вышеивановского белка); а также на Южный Алтай (протяженность маршрута более 2000 км) — на хр. Южно-Алтайский Тарбагатай.

Обработка нескольких способов стерилизации эксплантов родиолы выявила необходимость в подборе эффективного протокола для каждого типа экспланта — стеблевые, листовые сегменты, верхушечные или корневищные почки. Многоступенчатые протоколы стерилизации, включающие обработку гипохлоритом натрия, перманганатом калия, этиловым спиртом и перекисью водорода позволили получить стерильные первичные экспланты, жизнеспособность которых была на уровне 55–74,5 %. Стерилизацию семян родиолы проводили после предварительной стратификации в растворах гибберелловой кислоты (GA3) и тиомочевины, последняя помимо ростостимулирующего действия обладает еще и фунгицидной активностью.

Для инициации роста культур родиолы розовой в условиях *in vitro* использовались несколько вариантов питательных сред, на основе среды Мурасиге и Скуга с добавлением экзогенных фитогормонов в различных концентрациях. Реакция различных типов эксплантов родиолы зависела от типа и концентрации используемых фитогормонов. Образование каллусной ткани были инициировано только

при использовании листовых эксплантов, при этом наиболее высокие показатели наблюдали при использовании 2,4-Д и бензиламинопурина-6. Эффективным было использование в качестве эксплантов апексов побегов и проростков, которые при культивировании на индукционных средах, содержащих цитокинины и ауксины в соотношении 10:1, активно пролиферировали с образованием почечных конгломератов (см. рис.).



Индукция адвентивного органогенеза родиолы розовой *in vitro*

Наши эксперименты показали, что на апикальных эксплантах формирование конгломерата наблюдали и в отсутствии экзогенных регуляторов роста. Однако, на безгормональной среде почечные конгломераты быстро теряли свою жизнеспособность, сформированные побеги были очень короткими, плотно расположенными. Побеги второго уровня не успевали сформировать достаточной длины стебель, часть вновь возникающих адвентивных почек была некротизирована вследствие нарушения гормональной регуляции процессов морфогенеза. На наш взгляд, именно повышенное содержание фитогормонов с цитокининовой активностью в сочетании с гибберелловой кислотой приводит к интенсивному адвентивному побегообразованию (до 34 на эксплант), кроме того увеличивается рост побегов второго уровня и тем самым, повышается коэффициент размножения.

В последующем, регенерантные побеги длиной 2,5–4 см отсекались и помещались на среду для индукции ризогенеза, интенсивность которого зависела от комбинации регуляторов роста и плот-

ности среды. Высокие значения формирования корневой системы у регенерантных побегов родиолы наблюдали при концентрации агара от 4 % до 6 %, однако морфометрические показатели регенерантов родиолы (количество и длина корней, длина побегов и количество междоузлий) были выше на средах, содержащих 0,6 % агара. После формирования корневой системы на безгормональной среде МС, содержащей половинную норму солей, регенеранты высаживались в сосуды с почвогрунтом для адаптации.

Высадка растений регенерантов родиолы розовой в местах естественного произрастания была проведена в первой декаде июня, после прохождения угрозы поздних заморозков. Посадка опытных растений одинаковой морфолого-систематической принадлежности была проведена в Алтайском ботаническом саду в открытом грунте и в неотапливаемой теплице, покрытой поликарбонатом. Сохранность высаженных растений в теплице составила 100 %, в условиях *ex situ* составила 57 %. Наиболее активное появление новых побегов наблюдалось через 15 дней после посадки. Показатель побегообразования, помимо определения сроков наступления фенофаз развития, указывает на успешность процесса акклиматизации. Морфометрические характеристики растений-регенерантов родиолы розовой, высаженных в открытом грунте, были выше в сравнении с растениями из теплицы: растения формировали прямостоячие кусты, на отдельных растениях зафиксированы фазы бутонизации и цветения. Несмотря на то, что показатели первого года сохранности, роста и развития опытных растений в открытом грунте несколько ниже, чем в теплице, данный вариант технологии можно использовать для плантационного выращивания укорененных регенерантов родиолы розовой, полученных методом микроклонального размножения.

Таким образом, были оптимизированы отдельные этапы культивирования *in vitro* родиолы розовой — стерилизация, культивирование и индукция органогенеза, а также адаптация регенерантов к культивированию в условиях почвогрунта и условиях *ex situ*. Растения-регенеранты родиолы розовой, полученные методами биотехнологии могут быть использованы в качестве исходного материала для интродукции и реинтродукции вида. Внедрение в производство

технологии микроклонального размножения родиолы розовой с перспективой дальнейшей реинтродукции позволит сохранить генетическое разнообразие вида.

СОЗДАНИЕ РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА NEONOXE

DESIGNING OF RATIOMETRIC FLUORESCENT INDICATOR FOR HYDROGEN PEROXIDE BASED ON GENETICALLY ENCODED INDICATOR NEONOXE

А. С. Ревазян, Ю. Г. Ермакова, В. В. Белоусов

ФГБУН ИБХ им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

e-mail: aram93-95@mail.ru

Аннотация

Была получена ратиометрическая версия генетически-кодируемого индикатора NeonOxE на внутриклеточный пероксид водорода, W157C, характеризующаяся наличием выраженного пика в спектре возбуждения флуоресценции с максимумом при 408 нм, а также определены некоторые характеристики полученного мутанта.

Abstract

We derived a ratiometric version of a genetically — encoded indicator NeonOxE for intracellular hydrogen peroxide, with a pronounced cyan excitation maximum at 408 nm, determined the appropriate mutation, W157C, and measured some of its characteristics.

К настоящему времени для детекции пероксида водорода, выступающего в качестве сигнальной молекулы во многих клеточных

процессах [1], были созданы различные генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы, одним из которых является NeonOxE, относящийся к линии сенсоров HyPer [2].

NeonOxE — интенсификационный сенсор для детекции пероксида водорода, который обладает высоким контрастом сигнала и низкой pH-чувствительностью, однако, для него характерен спектр зеленых флуоресцентных белков с единственным пиком возбуждения флуоресценции, что представляет определенные трудности при корректной оценке величины сигнала в живых системах. Таким образом, целью настоящей работы стало получить ратиометрическую версию NeonOxE.

Производные NeonOxE были получены с помощью случайного мутагенеза. При последующем скрининге библиотек с использованием флуориметра была обнаружена ратиометрическая версия NeonOxE с выраженным максимумом пика в спектре возбуждения флуоресценции при 408 нм и определена соответствующая мутация, W157C. Кроме того, были измерены спектральные характеристики полученного мутанта, включая квантовый выход и pH-чувствительность, которые оказались сопоставимы с аналогичными значениями для исходной формы NeonOxE. Мутант был также экспрессирован в эукариотических клетках линии HEK293NT, где продемонстрировал в 4 раза менее контрастный сигнал по сравнению с исходной формой.

В дальнейшем планируется повысить контраст полученного варианта W157C. При условии устранения имеющегося недостатка, мутантная версия NeonOxE имеет все шансы стать одним из наиболее популярных индикаторов пероксида водорода из известных на сегодняшний день.

Литература

1. H. Sies, “Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 13, pp. 8735–8741, 2014.
2. K. A. Lukyanov and V. V. Belousov, “Genetically encoded fluorescent redox sensors,” *Biochimica et Biophysica Acta — General Subjects*, 2014.

**ОБМЕН HL-ФРАГМЕНТАМИ — ПРОЦЕСС,
СТИМУЛИРУЮЩИЙ ПОЯВЛЕНИЕ ПОЛИРЕАКТИВНЫХ
БИСПЕЦИФИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ***

**FAB ARMS EXCHANGE STYMULATES THE EMERGENCE
OF POLYREACTIVE BISPECIFIC ANTIBODIES**

С. Е. Седых, В. В. Принц, В. Н. Бунева, Г. А. Невинский

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

S. E. Sedykh, V. V. Prinz, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky
SB RAS ICBFM, NSU, Russia

e-mail: sedyh@niboch.nsc.ru

Аннотация

Процесс обмена HL-фрагментами впервые был показан *in vitro* и *in vivo* для IgG4. Мы показали, что данный процесс происходит *in vivo* в молоке, плаценте и крови человека, а также *in vitro* в присутствии восстановленного глутатиона и мажорного белка молока человека.

Abstract

Fab arm exchange was first shown *in vitro* and *in vivo* for IgG4. We have shown that this exchange takes place *in vivo* in human milk, blood and placenta as well as *in vitro* in the presence of reduced glutathione and major protein of human milk.

IgG molecules are presented as monovalent molecules with stable structures and two identical antigen-binding sites. However, we found that up to 54 % of human milk IgG molecules comprise κ - and λ - light chains

* The reported study was funded by RFBR, according to the research projects 16-34-60066 mol_a_dk, 16-04-00603 a, 16-04-00604 a.

simultaneously (bispecific molecules are presented mostly by IgG1 74 %). Placenta antibodies undergo extensive Fab arms exchange and IgG preparations in average consists up to 15 % of the $\kappa\lambda$ -IgGs (43.5 % of IgG1, 41.0 % IgG2). The reasons of significantly lower content of $\kappa\lambda$ -IgGs in placenta comparing to the milk are not yet clear. One can suppose that this may be due to a lower content of protein factor stimulating Fab arm exchange.

Here we consider the role of Fab arm exchange leading to bispecific antibody generation and use of such antibodies as new perspective markers of immune system disorders.

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE LIND. НА РОСТ ПРОРОСТКОВ
СОИ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ
ГРИБНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

EFFECTS OF EXTRACTS OF PLANTS OF FAMILY LAMIACEAE
LIND. ON THE GROWTH OF SEEDLINGS SOYBEAN
AND THEIR RESISTANCE TO AGENTS OF FUNGAL DISEASES

Сейтбатталова А. И., О. Н. Шемшюра, Э. Т. Исмаилова,
М. Н. Мазунина, Р. Ж. Каптагай

*РГП «Институт микробиологии и вирусологии»
КН МОН РК, Казахстан*

e-mail: aika2006_81@mail.ru

A. I. Seitbattalova, O. N. Shemshura,
E. T. Ismailova, M. N. Mazunina, Kaptagai R.

RSE «Institute of Microbiology and Virology» SC MES RK, Kazakhstan

Аннотация

В статье представлены результаты лабораторных исследований по влиянию предпосевной обработки семян сои водно-спиртовыми

экстрактами растений семейства *Lamiaceae Lindl* (монарды, чабера, базилика и иссопа) на ее рост в условиях искусственно созданного инфекционного фона. Установлено, что из всех исследуемых видов растений семейства *Lamiaceae Lindl*, наиболее перспективными в качестве стимулятора роста сои и защиты ее от грибных болезней, являются экстракты монарды и иссопа.

Abstract

The article presents the results of laboratory studies on the effect of preplant seed treatment of soybean hydro-alcoholic extracts of plants of the family *Lamiaceae Lindl* (monarda, savory, basil and hyssop) on its growth in the conditions of artificially created infectious background. It was found that out of all the studied species of plants of the family *Lamiaceae Lindl*, the most promising as a growth promoter soy and protect it against fungal diseases are extracts monarda and hyssop.

Основной задачей сельского хозяйства является повышение урожайности полевых культур, рост производства зерна на основе совершенствования защитных мероприятий от вредных организмов и применению биологического метода защиты растений от болезней [1]. В настоящее время такие заболевания сои, как фузариоз, альтернариоз, склеротиниоз, являются широко распространенными и вредоносными. Потери урожая от грибных болезней могут достигать 20–30 % [2]. Поэтому поиск альтернативных методов подавления популяций вредных видов путем использования экологически безопасных растительных препаратов, обладающих фунгицидными и ростостимулирующими весьма актуально. Несмотря на то, что по эффективности препараты, получаемые из растений уступают химическим средствам, тем не менее, они обладают способностью снижать численность популяций на 60–80 %. Это позволяет в ряде случаев сокращать число применяемых обработок химическими средствами и снижать их концентрацию за счет комбинирования с растительными препаратами [3].

Целью работы явилось исследование влияния растительных экстрактов некоторых видов растений семейства *Lamiaceae Lindl*. на рост проростков сои в условиях искусственно созданного инфекционного фона.

Для этого патогены, выделенные из ризосферы больных растений сои (*Alternaria compacta*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*), культивировались на жидкой среде Чапека-7 на качалке в течение 5 суток. Отдельно каждый патоген в количестве 5 мл вносили в стерильную почву, предварительно размещенную в контейнеры. Семена сои сорта Нена обрабатывались 2,5 % водно-спиртовыми экстрактами монарды, базилика, иссопа и чабера. В контроле семена обрабатывались в 2,5 % водно-спиртовом растворе. Обработанные семена сои вносились в зараженную патогенами почву по 15 штук в каждый контейнер. Повторность опыта — трехкратная. По истечения 10 дней проводили биометрические измерения и патологические изменения у выросших проростков сои.

Полученные результаты показали, что в варианте, где в почве присутствует *Alternaria compacta*, всхожесть семян после их обработки экстрактами растений превышала контроль на 6,6 % — 13,3 %, за исключением варианта с базиликом, в этом случае всхожесть была на уровне контроля. Длина стебля и корня после обработки всех взятых в опыте экстрактов значительно превышала контроль, при этом наибольшее превышение длины стебля и корня (более чем в 2 раза) отмечено в варианте с обработкой экстрактом монарды (рис. 1).

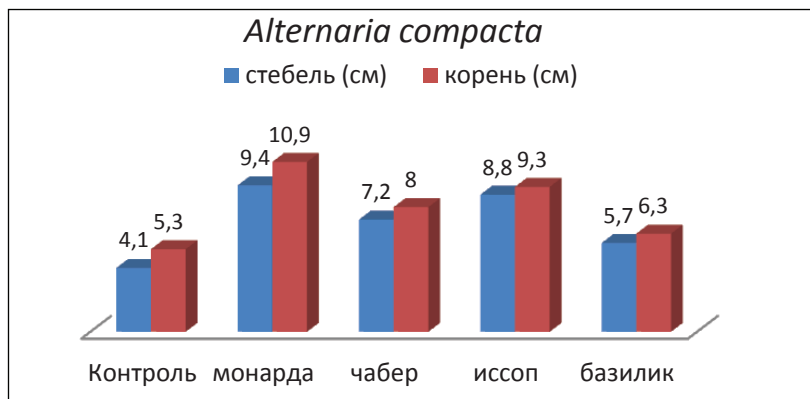


Рис. 1. Показатели роста сои на искусственно созданном инфекционном фоне с *Alternaria compacta*

В почве, искусственно зараженной *Fusarium oxysporum*, обработка семян растительными экстрактами также дала положительный результат, простимулировав их всхожесть, рост стебля и корня. При этом по всем биометрическим показателям лучшим для проростков сои оказался экстракт монарды. В этом случае всхожесть семян, длина стебля и корня превышали таковые в контроле на 22,2 %, 103 % и 94,6 % соответственно.

При сравнении показателей линейной длины проростков сои, после обработки семян экстрактами различных видов растений семейства *Lamiaceae* Lindl отмечено, что длина стебля в варианте с обработкой монарды превышает таковые в вариантах с чабером — в 1,4 раза, с иссопом — в 1,5 раза, и с базиликом — в 1,8 раза. Что касается длины корня, то в варианте с монардой она превышала таковую в 1,6 раз (чабер), в 1,4 раза (базилик) и незначительно иссопа. Из всех исследуемых экстрактов видов семейства *Lamiaceae* Lindl наиболее эффективными в качестве стимуляторов роста и защиты от фузариоза являются экстракты монарды и иссопа (рисунок 2).

В почве зараженной *Sclerotinia sclerotiorum*, за исключением чабера, все экстракты стимулировали всхожесть семян сои, которая превышала контроль на 15,6–39,9 %. Длина стебля и корня после обработки семян экстрактом монарды значительно превышает таковые во всех вариантах, включая контроль.

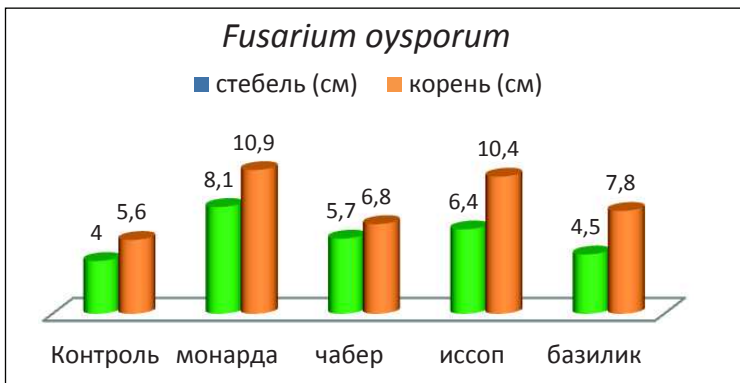


Рис. 2. Показатели роста сои на искусственно созданном инфекционном фоне с *Fusarium oxysporum*

Превышение линейной длины стебля в варианте с монардой по сравнению с контролем составило 4,4 см (контроль), 4,9 см (чабер). 2,4 см (иссоп) и 3,3 см (базилик). Что касается длины корня, то в варианте с монардой она превышала таковую в 2,1 раз (контроль), в 2,5 раза (чабер), в 1,4 раза (иссоп) и в 1,1 раз (базилик) (рис. 3).

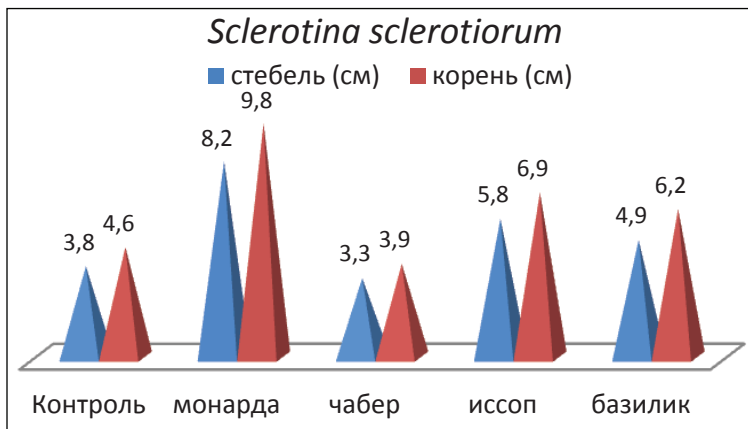


Рис. 3. Показатели роста сои на искусственно созданном инфекционном фоне с *Sclerotinia sclerotiorum*

Таким образом, проведенные исследования показали, что из всех исследуемых видов растений семейства *Lamiaceae* Lindl. наиболее перспективным в качестве стимулятора роста сои и защиты ее от комплекса фитопатогенных грибов, вызывающих почвенную инфекцию являются экстракты монарды и иссопа, что указывает на возможность создания на их основе экологически безопасных растительных биопрепаратов являющихся альтернативой химическим фунгицидам.

Литература

1. Особенности развития болезней на различных сортах сои и применение средств защиты в условиях орошения в зоне неустойчивого увлажнения Ставропольского края : Автореф. на соис. уч. степени

кандидата биологических наук; [Место защиты: Кубан. гос. аграр. ун-т]. Ставрополь, 2007. 14 с.

2. Абасова Т. И. Циркуляция пестицидов в биосфере и их экотоксикологическая оценка / Т. И. Абасова, А. А. Римиханов, Т. С. Астраханова // Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов. Краснодар.: Изд-во КубГАУ. 2005 С. 153–154.

3. Семаков В. В. Растительные экстракты в защите растений. Душанбе, 1989. 80 с.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ПОЛИСАХАРИДОВ *

Н. А. Степанов, О. В. Сенько, Е. Н. Ефременко

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

e-mail: elena_efremenko@list.ru

Разработка способов получения разнообразных биоразлагаемых природных полимеров из возобновляемого углеродсодержащего сырья является актуальной задачей [Rehm В. Н // Nat. Rev. Microbiol., 2010, 8(8), p.578–592].

Применение биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток представляет собой большой интерес в виду известных преимуществ перед суспензионными культурами: длительное и многократное использование, повышение эффективности процесса, уменьшение длительности процесса и др. [Е. Н. Ефременко, А. В. Nikolskaya, I. V. Lyagin, O. V. Senko, T. A. Makhlis, N. A. Stepanov, O. V. Maslova, F. Mamedova, S. D. Varfolomeyev // Bioresource Technology, 2012, 114, 342–348, N. Stepanov, E. Efremenko // New Biotechnology, 2016, E. N. Efremenko, N. A. Stepanov, A. B. Nikolskaya, O. V. Senko, O. V. Spiricheva, S. D. Varfolomeev // *Catalysis in Industry*, 3(1):41–46, 2011].

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-08-00457).

Несмотря на привлекательность иммобилизованных клеток, в мире отсутствует опыт по их использованию для получения полисахаридов, хотя уже довольно хорошо изучены процессы биосинтеза других высокомолекулярных соединений — белков (ферментов) в биокаталитических системах на основе иммобилизованных высококонцентрированных популяций [E. N. Efremenko, N. A. Stepanov, D. A. Gudkov, O. V. Senko, V. I. Lozinsky, S. D. Varfolomeev // *Catalysis in industry*, 5(2):190–198, 2013]. Это связано с существующей догмой о том, что иммобилизация целесообразна для клеток микроорганизмов только в случае получения низкомолекулярных продуктов.

В данной работе была получена серия биокатализаторов в виде иммобилизованных в макропористый носитель клеток, продуцирующих разные полисахариды (декстран, пуллулан, бактериальная целлюлоза).

В результате проведенных исследований была продемонстрирована высокая эффективность применения новых биокаталитических систем, в виде иммобилизованных клеток бактерий и дрожжей в процессах получения биоразлагаемых полисахаридов. Иммобилизованные клетки, находящиеся в состоянии высококонцентрированных популяций, характеризуются существенно более высокими скоростями метаболических процессов (в 1,5–3 раза), и более высоким выходом конечного продукта по сравнению со свободными клетками, что приводит к повышению эффективности процесса в целом. Кроме того была показана возможность многократного применения иммобилизованных клеток с сохранением на 95–100 % их метаболической активности.

Совокупность полученных результатов позволяет наглядно продемонстрировать возможности новых биокаталитических систем, в виде иммобилизованных в крупнопористые носители клеток разных микроорганизмов в процессах получения биоразлагаемых полимеров в виде полисахаридов и установить основные закономерности функционирования подобных клеточных популяций в таких биокаталитических системах.

НОВАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ДЛЯ «СТАРЫХ ПРИБОРОВ» — ЛАНТАНОИДНОЕ КОНТРАСТИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ СЭМ

NEW INFORMATIVE FOR “OLD DEVICES” — LANTHANOID STAINING OF BIOLOGICAL SPECIMENS FOR SEM

А. М. Суббот¹, И. А. Новиков¹, Т. В. Нестерова¹, И. В. Чеботарь²

¹ *ФГБНУ «НИИ глазных болезней»*

² *ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

A. M. Subbot¹, I. A. Novikov¹, T. V. Nesterova¹, Chebotar' I. V.²

¹ *Research Institute of Eye Diseases*

² *FSAI «Scientific Center of Children's Health»
of the Ministry of Health of the Russian Federation*

Аннотация

Представлены результаты исследования нескольких типов биологических образцов (клеточные культуры, биоптаты, бактериальные биопленки) методом СЭМ с альтернативной пробоподготовкой. Показано, что информативность полученных изображений шире, чем при использовании «классических» методов.

Abstract

We present results of examining several types of biological samples (cell cultures, tissue samples, bacterial biofilms) on SEM with an alternative sample preparation. It is shown that the informative value of images obtained is wider than using 'classical' methods.

Электронная микроскопия теряет свои позиции в ряду методов исследования биологических образцов, будучи применимой лишь в ограниченном числе случаев. Это происходит в том числе из-за

того, что классическая пробоподготовка для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) трудоемка, предполагает использование токсичных реагентов и часто приводит к появлению артефактов. Как явствует из сути электронно микроскопического исследования с напылением, классическая СЭМ позволяет оценить микрорельеф поверхности образца и только. Подповерхностный слой можно было бы визуализировать без напыления в «альтернативном режиме» обратно рассеянных электронов, однако в силу однородности клеток по элементному составу, при исследовании биологических образцов получается низкоконтрастное изображение. Поэтому в настоящее время актуален поиск новых способов подготовки биологических образцов для СЭМ, позволяющий детализировать внутреннюю структуру клетки. Нами предложен метод, позволяющий сделать биологические объекты более контрастными для детектора обратно рассеянных электронов — насыщение их элементами с высокими атомными номерами — металлами лантаноидной группы, имеющими тропность к определенным внутриклеточным структурам (ядро, цитоскелет, митохондрии). На основе этого метода разработан набор реагентов «Biogee» для пробоподготовки.

Исследование проводилось на тканевых биоптатах, бактериальных биопленках и клеточных культурах на различных подложках. Образцы подготавливали с использованием набора реагентов «Biogee» (пр-во ООО «Глаукон», РФ): промывали, затем помещали в контрастирующий раствор на основе хлорида неодима на 15–45 минут, промывали и высушивали «воздушной кистью». Подготовленные объекты размещали на предметном столике сканирующего электронного микроскопа (EVO LS10, CarlZeiss, Germany). Наблюдения велись в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), при ускоряющем напряжении от 5 до 30 кВ и токе на образце 400–520 пА.

Полученные изображения отличались более высокой информативностью по сравнению с микрофотографиями, сделанными с применением классических методов. На них четко визуализируются границы клеток, ядро с многочисленными ядрышками, особенно хорошо видны протяженные структуры цитоскелета (рис. 1). На многих микрофотографиях видна сеть ЭПР, прикрывающая ядро. Вокруг

некоторых клеток четко различим окружающий их внеклеточный матрикс. При визуализации клеток, взятых от больных с рецидивирующей эрозией роговицы, видна нарушенная архитектоника поверхностного клеточного пласта, а также разница в структуре поверхностного и подлежащего слоев (рис. 3). При визуализации мезенхимальных стволовых клеток на скаффолде Alvetex хорошо видно расположение клеток на ребрах пористой структуры материала (рис. 2). При визуализации бактериальных биопленок (рис. 4) четко видна их многослойная структура с конгломератами и отдельными клетками, что интересно — можно увидеть клетки в процессе деления — перетяжки цитоплазматической мембраны на еще неразделившихся частицах, также можно заметить, что зоны, где бактерии прилежат друг к другу — более яркие.

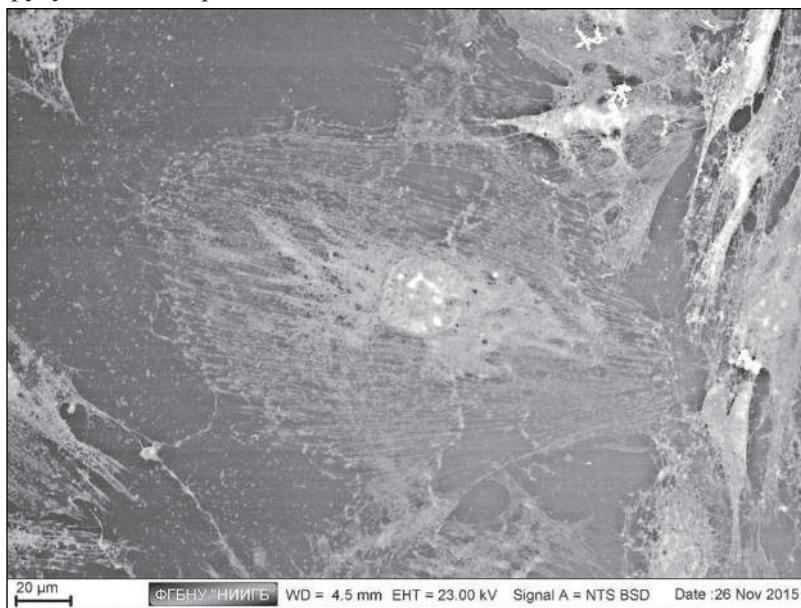


Рис. 1. BSE-изображение контрастированных лантаноидами астроцитов на культуральном пластике

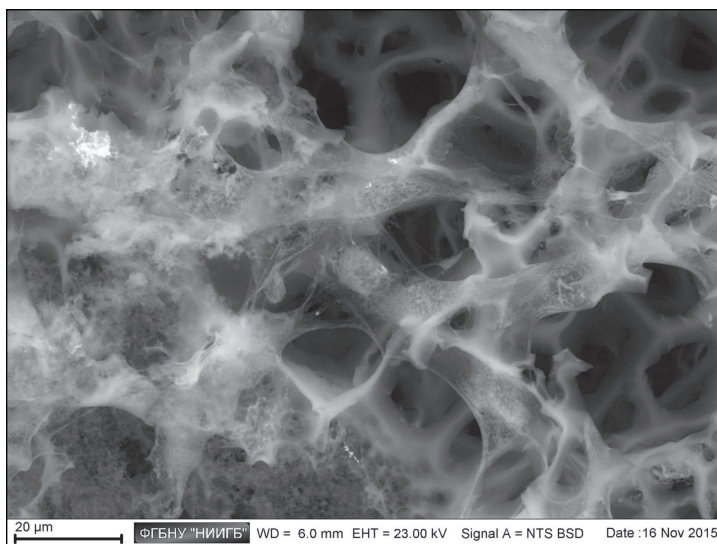


Рис. 2. BSE-изображение контрастированных лантаноидами МСК на пористой мембране Alvetex

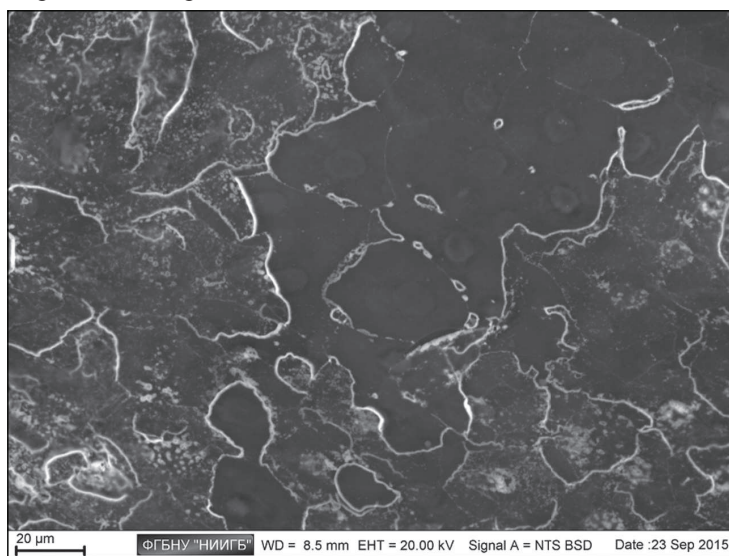


Рис. 3. BSE-изображение роговичного эпителия (рецидивирующая эрозия) контрастированного лантаноидами

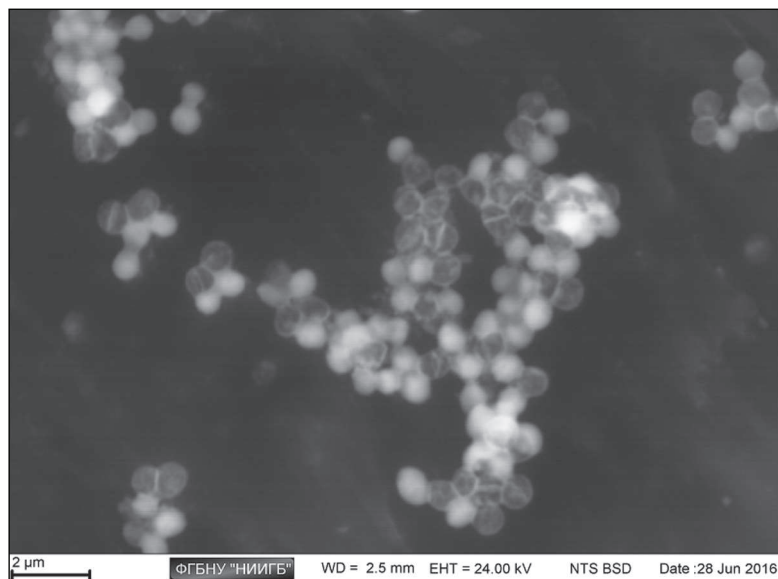


Рис. 4. BSE-изображение колонии *S.aureus* контрастированной лантаноидами

Таким образом, предложенный метод контрастирования биологических образцов существенно повышает информативность изображений, позволяя визуализировать не только поверхность клетки, но и ее органеллы, оценить архитектуру подповерхностного пространства и внеклеточный матрикс. Применение разработанного набора реагентов для изучения разнообразных биологических образцов, используя «старые приборы», дает возможность взглянуть на них по-новому.

СЕЛЕКЦИЯ ГОРОХА *IN VITRO* НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

SELECTION *IN VITRO* OF PEAS FOR STABILITY TO ABIOTIC STRESSES

Д. С. Тагиманова, Р. М. Сулейменов

*ТОО «Научно-производственный центр
зернового хозяйства им. А. И. Бараева», Казахстан*

D. S. Tagimanova, R. M. Suleimenov
LLS «Scientific Production Center of Grain Farming
behalf of A. I. Barayev», Kazakhstan

Аннотация

Селекция *in vitro* гороха на устойчивость к осмотическому стрессу проведена методом непрерывного отбора. Определено влияние селективного агента на показатели каллусогенеза и органогенеза гороха. На селективных средах получены устойчивые растения-регенеранты.

Abstract

Selection of peas *in vitro* for resistance to osmotic stress carried by continuous selection. The effect of the selective agent in the indicators of callus formation and organogenesis pea determined. Regenerated plants resistant to osmotic stress obtained on selective media.

Горох (*Pisum sativum* L.) наряду с ячменем и пшеницей является одной из старейших культур в мире. Довольно часто горох подвержен воздействию различных видов стрессов. В условиях Северного Казахстана посевы гороха подвергаются воздействию засухи. Для снижения потерь урожая гороха и его качества важно иметь в производстве высокопродуктивные сорта, обладающие устойчивостью

к стрессовым факторам среды, в связи с этим необходим *поиск и привлечение современных достижений науки, ускоряющих и повышающих результативность селекционного процесса. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов.*

На клеточном уровне устойчивость к засухе выражается в толерантности клеток к присутствию в питательной среде осмотически активных веществ, понижающих внешний водный потенциал [1]. Для отбора *in vitro* в качестве селективных агентов, как правило, используют полиэтиленгликоль, маннит, сорбит, NaCl. Наиболее успешно в качестве фактора отбора применяется ПЭГ с молекулярной массой 6000. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) — не-проникающий осмотик, вызывает коллапс клеточных стенок и сжатие протопласта, то есть хорошо имитирует водный баланс клетки в условиях осмотического стресса [2].

Адекватность реакции каллусных клеток на действие селективного агента зависит от концентрации селективного фактора в среде для культивирования каллусов. В предыдущих исследованиях нами были определены оптимальные концентрации ПЭГ-6000, которые составляли 2–5 % к объему индукционной среды. Формирование каллусной ткани происходит сразу в селективных условиях, селективный агент воздействуют на все этапы и процессы жизнедеятельности клетки. В качестве контроля использовали базовую среду МС без добавления селективного фактора.

Реакцию каллусных тканей гороха оценивали по таким показателям, как количество сформировавшихся каллусов (%) и масса первичных каллусных тканей (мг). Результаты исследований показали, что в процессе культивирования каллусов в селективных условиях меняются органолептические характеристики: наблюдается потемнение цвета каллусов, некротизация отдельных участков каллусов. Реакция генотипов и их каллусообразующая способность при воздействии селективного фактора была различной. Наибольшее влияние селективный агент оказывал на массу каллусных тканей, чем на интенсивность каллусообразования. Однако на средах с высокими

концентрациями осмотика (до 10 %) наблюдали отсутствие пролиферации клеток, усыхание и некроз эксплантов.

Дальнейшие исследования были направлены на получение устойчивых морфогенных каллусов гороха и регенерацию проростков. Такие показатели, как количество выживших каллусов и интенсивность морфогенеза, определялись генотипическими особенностями, в то время как значения массы каллусов и прироста биомассы в значительной степени зависели от концентрации селективного агента. Регенерацию растений осуществляли также на селективных средах в присутствии гормонов БАП и НУК, соотношение которых составляло 40:1. Полученные растения-регенеранты в данный момент размножены с использованием технологии микроклонирования и высажены в сосуды с почвогрунтом.

В результате отбора *in vitro* на дальнейший этап — среду для индукции морфогенеза было пассировано около 552 каллусов, из которых индуцировано 325 регенерантных побега. Ризогенез был индуцирован только у 75 побегов, в почву высажено 196 растений регенерантов, из которых 56 — на средах с ПЭГ-6000.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использованный нами метод непрерывного отбора устойчивых тканей гороха, начиная с этапа каллусогенеза и завершая индукцией органогенеза, позволяет значительно повысить эффективность селекции *in vitro*.

Литература

1 Долгих Ю. И. Результаты и перспективы использования клеточной селекции для создания перспективных форм растений // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. М., 2004. С. 114–115.

2 Аль-Холани Х. А., Долгих Ю. И. Сравнение эффективности селективных систем с маннитом и полиэтиленгликолем для отбора засухоустойчивых растений кукурузы // В кн.: Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. М., ФБК-Пресс, 2008. С. 18–19.

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГМ-КСФ И ЛАКТАПТИН

ONCOLYTIC POTENTIAL OF VACCINIA VIRUS RECOMBINANT STRAINS PRODUCING GM-CSF AND LAKTAPTIN

А. В. Ткачёва, О. В. Коваль, А. А. Гражданцева,
Г. Ф. Сиволобова, Г. В. Кочнева, В. А. Рихтер

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

A. V. Tkacheva, O. V. Koval, A. A. Grazhdantseva,
G. F. Sivolobova, G. V. Kochneva, V. A. Richter
SRC VB "Vector", Russia

Аннотация

Вирус осповакцины в настоящее время широко используется для создания противоопухолевых препаратов. В данном исследовании нашей целью было создать рекомбинантные штаммы вируса осповакцины с делециями генов тимидинкиназы и ростового фактора с усиленными противоопухолевыми свойствами за счет встройки трансгенов: гена противоопухолевого белка лактаптина и гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Сравнительный анализ онколитической активности рекомбинантных штаммов был проведен на культурах клеток рака молочной железы с использованием реагента ХТТ. Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact обладал наибольшей активностью в экспериментах *in vitro* и был в дальнейшем использован в экспериментах *in vivo* на мышях линии SCID с ксенографтами опухоли MDA-MB-231. Внутривенное введение VV-GMCSF-Lact мышам линии SCID ингибировало опухолевый рост и в заключительной точке эксперимента (74 сутки) уровень ингибирования роста опухоли составил 81 %.

Abstract

Vaccinia virus oncolytic therapy has shown successful effects against a number of tumor models. In this study our goal was to generate double recombinant vaccinia virus with enhanced antitumor activity which expresses exogenous proteins: the antitumor protein lactaptin and human granulocyte-macrophage colony stimulating factor and has deletions of the thymidine kinase (*tk*) and vaccinia growth factor (*vgf*) genes. Comparative study of oncolytic activity recombinant vaccinia virus strains was performed on a human breast cancer cells using the XTT reagent. Recombinant strain VV-GMCSF-Lact has the greatest activity *in vitro* and was used in further *in vivo* experiments on the SCID line mice with xenograft of MDA-MB-231 tumors. Intratumoral injection of VV-GMCSF-Lact inhibited tumor growth and in the final point the inhibition rate was 81 %.

Конструирование рекомбинантных штаммов вируса осповакцины (VACV) с целью создания на их основе противоопухолевых препаратов является перспективным направлением биотехнологии. Ряд таких штаммов в настоящее время успешно проходят клинические испытания за рубежом. Многочисленные природные свойства вируса осповакцины делают его перспективным онколитическим вирусом.

На основе штамма Л-ИВП нами сконструированы два рекомбинантных штамма с делециями генов тимидинкиназы (*tk*) и ростового фактора (*vgf*). Эти гены кодируют факторы вирулентности, и их удаление приводит к практически полной неспособности вируса реплицироваться в нормальных неделящихся клетках, но при этом сохраняется литическая активность в отношении раковых. Для усиления противоопухолевой активности в район делеции гена *vgf* проведена встройка двух трансгенов, кодирующих разные формы онкотоксического белка лактаптина. Лактаптин является фрагментом каппа-казеина человека и обладает адресной апоптоз-индуцирующей активностью в отношении клеток рака молочной железы. Один из трансгенов представляет собой оперон, состоящий из синтетического ранне-позднего промотора VACV и гена

лактапина. Второй трансген содержит секретируемую форму лактапина за счет наличия в N-концевой части белка лидерного фрагмента гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Секретируемая форма белка обеспечивает так называемый «эффект соседа», то есть дополнительное цитотоксическое действие на соседние с инфицированной рекомбинантным вирусом клетки внутри опухоли за счет передачи белка через межклеточное пространство.

Поскольку при лизисе раковых клеток происходит высвобождение ассоциированных с опухолью антигенов, которые, как известно, являются слабо иммуногенными, необходимо введение дополнительного иммуностимулирующего цитокина. Лучшим на данный момент является ГМ-КСФ. Ген ГМКСФ человека был встроен в район делеции *tk* гена. Таким образом, сконструированы два двойных рекомбинантных штамма Л-ИВП с фенотипом ТК-ГМКСФ⁺VGF-Lact⁺ (штамм VV-GMCSF-Lact) и ТК-ГМКСФ⁺VGF-S-Lact⁺ (штамм VV-GMCSF-S-Lact). Для оценки онкотоксических свойств лактапина нами был дополнительно сконструирован контрольный рекомбинантный вариант VV-GMCSF-dGF, имеющий аналогичную опытным рекомбинантам структуру, но не содержащий встройки гена лактапина, фенотип ТК-ГМКСФ⁺VGF-Lact⁺.

Сравнительную оценку онколитической активности полученных рекомбинантных штаммов проводили на четырех культурах клеток рака молочной железы:

MCF-7 — эпителиальные клетки аденокарциномы молочной железы;

MDA-MB-231 — клетки эстроген-независимой инвазивной аденокарциномы молочной железы, метастатический сайт, плевральная эмфизия;

BT-549 — клетки эстроген-независимой инвазивной дуктальной карциномы молочной железы, первичный узел;

BT-20 — клетки эстроген-независимой карциномы молочной железы, первичный узел.

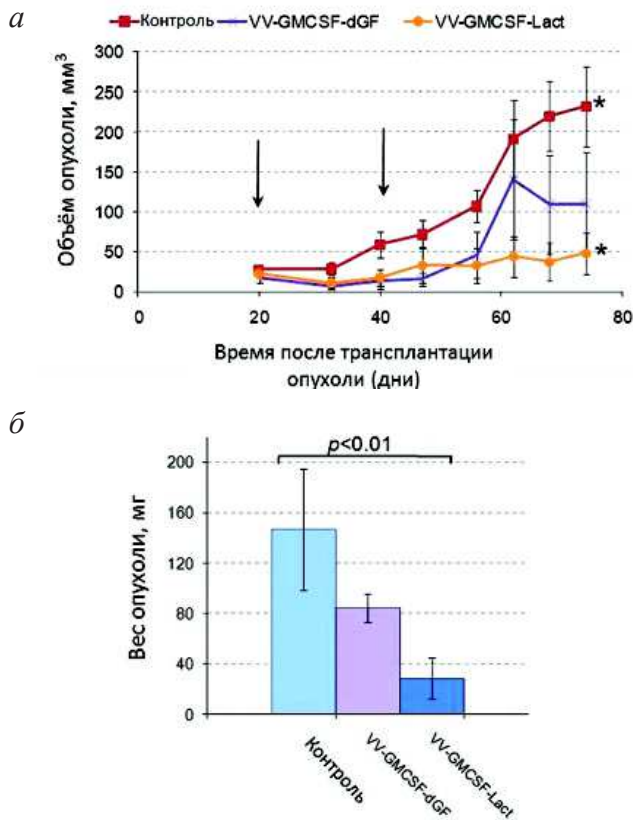
**Цитотоксическая активность рекомбинантных штаммов
вируса осповакцины, продуцирующих ГМ-КСФ
и лактаптин, в отношении раковых клеток
молочной железы человека**

Штамм вируса	Культура клеток, ЦТД ₅₀ (БОЕ/клетка *)			
	MCF-7	MDA-MB-231	BT-549	BT-20
VV-GMCSF-Lact	0,045	0,005	0,00083	0,004
VV-GMCSF-S-Lact	0,039	0,007	0,002	0,036
VV-GMCSF-dGF	0,085	0,008	0,0037	0,04

* ЦТД₅₀ выражали в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ), образованных вирусом на монослое клеток CV-1, вызывающих гибель одной раковой клетки.

Как следует из таблицы, оба рекомбинантных штамма, продуцирующих лактаптин, обладают более высокой литической активностью в отношении раковых клеток, чем контрольный рекомбинант VV-GMCSF-dGF. Клетки MCF-7 являются наименее чувствительными к литическому действию рекомбинантов.

Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact обладает наибольшей активностью *in vitro* и был использован далее в экспериментах *in vivo* на мышах линии SCID с ксенографтами опухоли MDA-MB-231. Для сравнения также использовался рекомбинант VV-GMCSF-dGF. Эксперименты проводили в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН. Как следует из рисунка, двукратное внутривенное введение обоих рекомбинантов в дозе 1×10^8 БОЕ/мышь приводит к значимому замедлению роста опухоли по сравнению с контролем. При этом продуцирующий лактаптин рекомбинант VV-GMCSF-Lact оказывал значимо больший противоопухолевый эффект. В заключительной точке эксперимента (74 сутки) уровень ингибирования роста опухоли составил 81 % для VV-GMCSF-Lact в сравнении с 42 % для VV-GMCSF-dGF как по объему (см. рис., а), так и по весу опухоли (см. рис., б).



Штамм VV-GMCSF-Lact ингибирует рост опухоли молочной железы человека, моделированной на мышах линии SCID. Клетки опухоли MDA-MB-231 подкожно прививали мышам и через 20 и 40 суток внутривенно вводили вирус или физиологический раствор (контроль) в объеме 100 мкл: *a* — динамика роста опухолей. Стрелками указаны дни введения вируса. Звездочка обозначает достоверность различий между группами ($p < 0.01$); *б* — через 74 дня от начала эксперимента осуществляли эвтаназию мышей методом ингаляции углекислым газом, опухоли извлекали и взвешивали

Рекомбинантный штамм VV-GMCSF-Lact не вызывал развития токсических реакций и не обладал реактогенным действием при внутривенном введении в дозе 1×10^8 БОЕ/мышь.

Заключение

Сконструирован двойной рекомбинант вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact с встройкой генов ГМ-КСФ и лактапина и делециями генов тимидинкиназы и вирусного ростового фактора. Рекомбинант VV-GMCSF-Lact обладает значимо большей онколитической активностью в отношении клеток рака молочной железы человека как *in vitro*, так и *in vivo* по сравнению с аналогичным по структуре контрольным рекомбинантом VV-GMCSF-dGF, но не экспрессирующим ген лактапина. Штамм VV-GMCSF-Lact является перспективным для создания на его основе противоопухолевого препарата.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ CASE12 И CHR2-VENUS В АСТРОЦИТЫ

USING OF ADENOVIRAL VECTORS FOR GENE DELIVERY OF CASE12 AND CHR2-VENUS IN ASTROCYTES

С. А. Тутукова, Н. В. Пономарева, Е. В. Митрошина,
Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова, А. А. Бабаев

*Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н. И. Лобачевского*

S.A. Tutukova, N.V. Ponomareva, E.V. Mitroshina,
T.A. Mishchenko, M.V. Vedunova, A.A. Babaev
Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
Nizhny Novgorod, Russia

e-mail: tutukova.sveta@yandex.ru

Аннотация

На основе вирусов созданы специализированные молекулярные конструкторы — рекомбинантные вирусные векторы, способные эф-

эффективно транспортировать ген-интереса внутрь клеток. Разнообразие вирусных векторов велико, все они имеют свои преимущества и недостатки. Аденовирусные векторы обеспечивают высокие титры рекомбинантного вируса и высокий уровень экспрессии вводимых генов.

Abstract

Specific molecular constructs — recombinant viral vectors able to effectively transport a gene of interest inside cells — were created on the basis of viruses. A variety of viral vectors is large; they all have their advantages and disadvantages. Adenoviral vectors produce recombinant virus at high titer with high-level expression of genes introduced.

AVV-GFAP-ChR2-Venus and AVV-GFAP-Case12 viral constructs kindly provided by Prof. Sergey Kasparov (School of Medical Sciences, University of Bristol) were used in the present research. Viral vectors were designed using GFAP (glial fibrillary acidic protein) astrocytic promoter. AVV-GFAP-ChR2-Venus represents a fusion construct consisting of Channelrhodopsin2 (ChR2) fused to Venus yellow fluorescent protein (Ex/Em 515/528) necessary to visualize the expression. ChR2 forms an ion channel in the cell membrane and is activated when exposed to light with a wavelength of 470 nm allowing Na, Ca и K ions to pass through, which, in its turn, allows monitoring various metabolic processes in cells. AVV-GFAP-Case12 contains a genetically encoded fluorescent biosensor for analyzing fluctuations in intracellular calcium ion concentration (Ex/Em 484/507).

The aim of this work is to test the possibility of using GFAP-ChR2-Venus and AVV-GFAP-Case12 adenoviral vectors in mono-culture of primary astrocytes from mice.

In this research, amplification of viral vectors in HEK 293FT cell culture was carried out. The viruses were purified and concentrated using Amicon ultra-15 (Merc Millipore) centrifugal filter devices. Mono-cultures of primary astrocytes were obtained from the cortex of newborn (P0-P2) mice, grown in DMEM medium containing 10 per cent serum, 100 mg/ml

C3H3NaO3 and 10 μ l/ml B-27 additive (Invitrogen). The cultures were infected on day 10 of culture. Expression of viral vectors was detected using the Karl Zeiss LSM 510 confocal laser-scanning microscope on day 5 of culture (*fig. 1, fig. 2*).

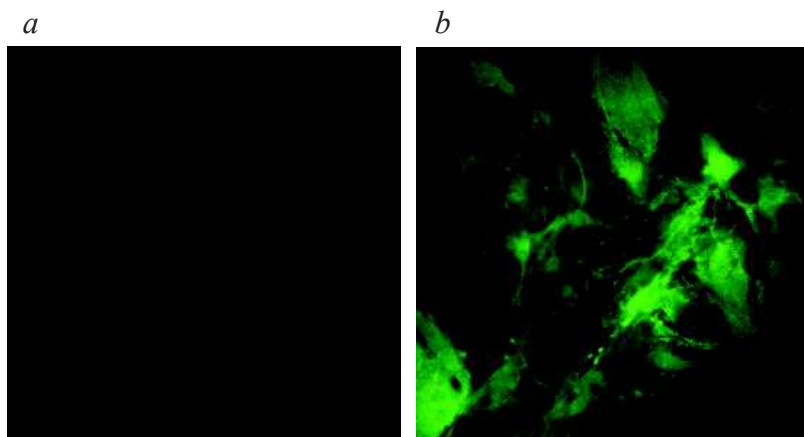


Fig. 1. a — astrocytes without viral vectors; *b* — astrocytes expressing AVV-GFAP-Case12

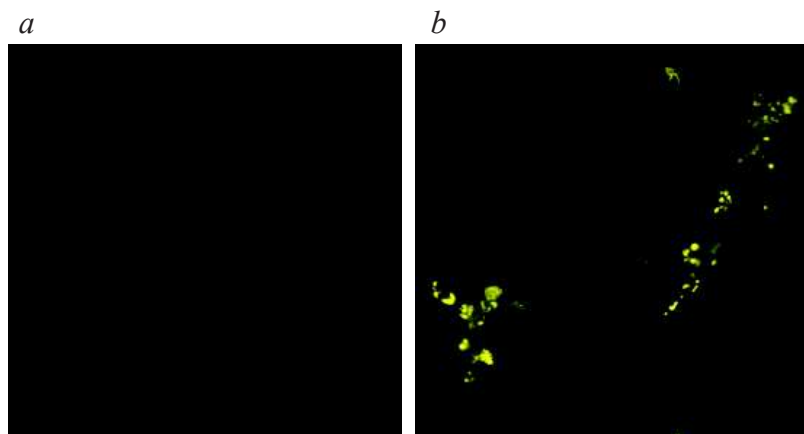


Fig. 2. a — astrocytes without viral vectors; *b* — astrocytes expressing AVV-GFAP-ChR2-Venus

Conclusion: thus, it was possible to detect the possibility of using GFAP-ChR2-Venus and AVV-GFAP-Case12 adenoviral vectors in mono-culture of primary astrocytes from mice. The viruses that have been amplified and tested in mono-cultures of primary astrocytes are expected to be used for optical stimulation experiments for astrocytes cultures in vitro, and *in vivo* with laboratory animals.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ СЛОЖНЫХ СМЕСЕЙ БИОМОЛЕКУЛ НА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОМ И ПОЛУПРОМЫШЛЕННОМ УРОВНЯХ

PROTEIN SEPARATION AND PURIFICATION: LAB-SCALE AND PILOT-SCALE APPROACHES

Н. П. Фадеева

*ООО «Компания Хеликон», 119991 Москва, Ленинские горы, МГУ,
дом 1, строение 40, НИИ Физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского, Лабораторный корпус «А»*

N. P. Fadeeva

ООО Helicon Company, 119992, Moscow, Leninskye gory, house 1,
building 40, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology

e-mail: n.fadeeva@helicon.ru

Аннотация

Развитие новых способов и методик очистки белков является необходимым условием прогресса биотехнологии. Хроматография, как один из наиболее гибких и эффективных методов разделения, стала важным инструментом и в лабораториях, и на производстве, где требуется выделение и очистка белка из сложных биологических смесей.

Abstract

Progress of biotechnology depends on development of new methods of protein purification. As one of the most flexible and effective separation technique chromatography has become an important method both on laboratory and pilot scales, where complex biological compounds should be separated.

Большинство стратегий очистки включают те или иные формы хроматографии, различные как по принципу, так и по эффективности и скорости разделения компонентов смеси. Залог успешной и эффективной очистки белков — это выбор наиболее подходящих техник и объединение их в единый логический путь, увеличивающий выход и минимизирующий число шагов. Хроматографические методы с различной селективностью и разрешением, грамотно скомбинированные и оптимизированные, могут стать мощным инструментом для очистки любых биомолекул.

Целью этой работы была разработка единого протокола оптимизации условий очистки белков и рассмотрение возможности автоматизации многостадийных многоколоночных протоколов на современном научном оборудовании для хроматографического разделения.

В ходе оптимизации была подобрана наиболее эффективная комбинация хроматографического сорбента, значений pH и градиента соли буферных растворов на примере очистки фиолетового белка, хромогенного рекомбинантного белка с массой 26 кДа. Выбор оптимальных условий определялся по итогам сравнения полученных хроматограмм и подтверждался результатами гель-электрофореза.

Для создания автоматического протокола разделения с одновременным использованием нескольких колонок была использована жидкостная хроматографическая система NGC Discover 10 (Bio-Rad). В ходе эксперимента был определен минимальный набор функциональных модулей жидкостной схемы, необходимый для проведения очистки в автоматическом режиме, и разработаны несколько тестовых протоколов для многоколоночной последовательной и тандемной очистки белков.

**НОВЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ РАЗМЕРОВ
ЦИЛИНДРИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ (В ТОМ ЧИСЛЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ) МЕТОДОМ ДЕПОЛЯРИЗОВАННОГО
РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ЖИДКИХ ДИСПЕРСИЯХ***

A NOVEL APPROACH TO DETERMINATION OF CYLINDRICAL
NANOPARTICLES SIZES (INCLUDING BIOLOGICAL) BY
DEPOLARIZED LIGHT SCATTERING IN LIQUID DISPERSIONS

П. В. Шалаев, С. А. Долгушин, С. А. Терещенко

Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

P. V. Shalaev, S. A. Dolgushin, S. A. Tereshchenko
National Research University of Electronic Technology

e-mail: shalaev.pv@gmail.com

Аннотация

Предложена новая модель для описания степени деполяризации света, прошедшего через образец жидкой дисперсии хаотично ориентированных наночастиц цилиндрической формы. Модель позволяет определить среднее аспектное отношение частиц в образце. Полученные результаты исследования тестовых модельных объектов в виде наностержней коллоидного золота могут быть использованы для разработки новых методов определения геометрических параметров несферических частиц, в том числе биологических.

Abstract

A new empirical model for the depolarization of the light passing through the liquid dispersion of randomly oriented nanorods is presented. This model allows to find the average aspect ratio of

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.581.21.0014, идентификатор RFMEFI58115X0014).

nanoparticles in a dispersion. Obtained results of gold nanorods studies can be utilized in novel experimental methods for the determination of geometric parameters of non-spherical particles, including biological nanoparticles.

Задача исследования свойств наноразмерных частиц и структур, в том числе биологических, чрезвычайно актуальна сегодня. В качестве примера можно привести определение геометрических параметров клеток крови при гемотрансфузии для оценки качества и жизнеспособности тромбоцитов в плазме крови. В настоящее время не существует быстрых, достоверных и недорогих методов для оценки состояния тромбоцитов, качество которых может существенно деградировать при хранении плазмы вследствие их спонтанной активации, агрегации и т. п. [1]

Наиболее распространенным методом исследования наночастиц на сегодняшний день является электронная микроскопия. Несмотря на то, что при наличии современной техники исследователи получают четкие и контрастные изображения, микроскопические методы имеют ряд существенных недостатков. Основной из них связан с тем, что результаты анализа в большой степени зависят от способа и условий пробоподготовки (например, может быть невозможно определить, произошла ли агрегация частиц в исходной суспензии или в момент высушивания образца на подложке).

В последнее время активно развиваются оптические методы исследования различных рассеивающих объектов, в том числе биологических. Оптические методы имеют ряд неоспоримых преимуществ, поскольку обладают высокой чувствительностью, выполняются неинвазивно, бесконтактно и с высокой скоростью проведения измерений.

В методе динамического рассеяния света (ДРС) измеряют временную корреляционную функцию, позволяющую найти коэффициент диффузии и радиус наночастиц. Однако в существующих приборах получение информации о размерах частиц основано на предположении об их сферической форме. Измерение геометрических параметров несферических частиц является существенно более сложной задачей и носит в настоящее время исследовательский характер.

Одним из путей, позволяющих определить геометрические параметры несферических частиц, является измерение поляризационных характеристик рассеянного света [2].

Была проведена серия экспериментов по исследованию деполяризации света, рассеянного в водной дисперсии наночастиц. В качестве тестовых модельных объектов использовались наностержни коллоидного золота. Образцы, использованные в экспериментах, были синтезированы в лаборатории нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН [3].

Геометрические параметры образцов были предварительно исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). В результате анализа ПЭМ-изображений были получены распределения частиц в образце по размерам, также было установлено, что для образцов характерно наличие квазисферических примесей.

В эксперименте регистрация интенсивности рассеянного излучения осуществлялась для разных углов рассеяния и при углах поворота оси поляризатора, стоящего перед фотоприемником 0° (VV-поляризация) и 90° (VH-поляризация) по отношению к вертикальной плоскости поляризации линейно поляризованного излучения диодного лазера с длиной волны 657,8 нм. Измерения были проведены с помощью модернизированного анализатора размеров частиц Photocor Complex (ООО «Фотокор», Россия).

Измерялась степень деполяризации света — отношение интенсивности деполяризованного компонента к общей интенсивности рассеянного света, для образцов водных дисперсий золотых наностержней с разными средними аспектными отношениями. В результате эксперимента было показано влияние формы наноразмерных частиц на степень деполяризации однократно рассеянного света. Для объяснения полученных результатов разработана модель для описания степени деполяризации света, прошедшего через образец жидкой дисперсии хаотично ориентированных наночастиц цилиндрической формы. Модель позволяет рассчитать зависимость степени деполяризации рассеянного света от среднего аспектного отношения с учетом известного распределения частиц по аспектному отношению и наличия примесей квазисферической формы. Таким образом, предложенная

модель позволяет определить среднее аспектное отношение частиц в образце. Предложенная модель также позволяет найти количество квазисферических примесей в дисперсии, в случае если известно среднее аспектное отношение наностержней в образце.

Полученные результаты исследования тестовых модельных объектов в виде наностержней коллоидного золота могут быть использованы для разработки новых методов определения геометрических параметров несферических частиц, в том числе биологических, например, таких как иммуноглобулины, белковые комплексы, внеклеточные везикулы, экзосомы, бактериофаги и т. п. [4–6]

Литература

1. Labrie A., Marshall A., Bedi H., Maurer-Spurej E. Characterization of platelet concentrates using dynamic light scattering // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013. Vol. 40(2). P. 93–100.
2. S.A. Dolgushin, I.K. Yudin, V.A. Deshabo, P.V. Shalaev, S.A. Tereshchenko, “Depolarization of light scattered in water dispersions of different shape nanoparticles,” *Biomedical Engineering*, Vol. 49, P. 52–55, 2015.
3. B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeev, J. Ye, G.B. Sukhorukov, N.G. Khlebtsov “Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture,” *Langmuir*, vol. 30, pp. 1696–1703, 2014.
4. Гибизова В. В., Аненкова К. А., Масленникова А. Д. и др. Определение фундаментальных физических параметров белков сыворотки крови для развития методов диагностики злокачественных новообразований // *Альманах клинической медицины*. 2016;44(2):158–164.
5. V.A. Borzova, K.A. Markossian, N.A. Chebotareva et.al. Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin // *PLOS ONE*, 2016, ISSN 1932–6203, Vol. 11, Is. 4, P. e0153495
6. R. Tarallo, A. Accardo, A. Falanga, et.al. Clickable Functionalization of Liposomes with the gH625 Peptide from Herpes simplex Virus Type I for Intracellular Drug Delivery // *Chemistry — A European Journal*, 2011, ISSN 1521–3765, Vol. 17, Is. 45, P. 12659–12668.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Е ВИРУСА ЗИКА И ЕГО ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ

OBTAINING PRODUCERS OF RECOMBINANT PROTEIN VIRUSES ZIKA AND ITS CHARACTERISTICS

Д. В. Шанышин, И. Р. Иматдинов, Ю. В. Никонорова,
Н. В. Волкова, Д. Н. Щербаков

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

D. V. Shanshin, I. R. Imatdinov, Y. V. Nikonorova,
N. V. Volkova, D. N. Scherbakov
SRC VB "Vector", Russia

e-mail: shanshin_dv@vector.ru

Аннотация

По данным ВОЗ случаи заражения вирусом Зика зарегистрированы в 72 странах, из них в 55 странах начиная с 2015 г. На текущий момент в Российской Федерации диагностической тест-системы не существует. При этом разработка диагностикумов с использованием живого вируса затруднена необходимостью соблюдения высокого уровня биозащиты, в связи с этим нами были предложены прокариотические продуценты, экспрессирующие химерные фрагменты белка Е вируса Зика, потенциально пригодные в качестве антигенов для создания серологических тест-систем.

Abstract

According to WHO cases of Zika virus registered in 72 countries, including 55 countries starting from 2015. At the moment Russian Federation diagnostic test systems do not exist. While the development of Diagnostics using live virus to be hampered by the need to comply with high level of biosecurity, in this regard, we proposed

prokaryotic producers expressing chimeric fragments Zika virus E protein, potentially useful as antigens to create a serological test systems.

Вирус Зика — представитель семейства *Flaviviridae* рода *Flavivirus*, названный в честь местности, где в 1947 году впервые был выявлен у Макак-резус (лес Зика в Уганде, Восточная Африка) [1]. К семейству *Flaviviridae* относятся также возбудители желтой лихорадки, лихорадок денге и Западного Нила, комплекса клещевого энцефалита и других инфекционных заболеваний [2,3]. 1 февраля 2016 года Всемирная организация здравоохранения объявила лихорадку Зика угрозой общественному здоровью международного уровня [4,5]. Чаще всего вирус Зика передается при укусах зараженных комаров рода *Aedes*, в большинстве случаев *Aedes aegypti* [6]. Вакцинных и диагностических препаратов против вируса Зика в настоящее время в РФ не разработаны.

Так как работа с живым вирусом Зика возможно проводить только в условиях биологической защиты, а применение инактивированного вируса для производства диагностических тест-систем усложнено необходимостью культивирования, проверки полноты инаktivации и безопасности, то создание и применение продуцентов рекомбинантных белков позволяет решить все выше указанные проблемы. В связи с этим нами были получены прокариотические продуценты рекомбинантного химерного белка Е вируса Зика.

Для выбора клонируемого участка был проведен биоинформатический анализ вирусного полипептида вируса Зика. Данный анализ позволил определить, что рекомбинантный полноразмерный гликопротеин Е с высокой вероятностью будет нерастворим, что в дальнейшем может усложнить его получение, очистку и рефолдинг. В связи с этим было решено использовать небольшие имуногенные фрагменты гликопротеина Е вируса Зика размерами 348 а.о. и 187 а.о.

С целью создания конструкций для экспрессии генов, кодирующих фрагменты белка Е вируса Зика, использовали плазмиду рЕТ32а. Использование рЕТ-системы обеспечивает индуцибельную экспрессию целевых полипептидов с лидирующей аминокислотной последовательностью тиоредоксина А (ТгхА), что повышает растворимость химерного белка и облегчает рефолдинг при необходимости.

В качестве матрицы для постановки ПЦР использовали плазмиду, содержащую синтезированную нуклеотидную последовательность участка генома вируса Зика штамм *ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015* [GenBank: KX197192.1]. При расчете олигонуклеотидов в последовательности праймеров были включены сайты рестрикции Bsp19I и Sfr274I. Для амплификации использовали Pfu-полимеразу, фактические размеры ампликонов соответствовали расчетным и составили 1044 п.н. и 561 п.н. Полученные ампликоны и акцепторная плазида гидролизировались по выбранным сайтам рестрикции в буферах и условиях, рекомендованных производителем эндонуклеаз (SibEnzyme, Россия). Продукты гидролиза подвергали электрофоретическому разделению, ДНК-фрагменты, соответствующие вставкам и вектору, очищали от агарозного геля с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Sciences, США). Выделенные продукты гидролиза лигировали в соответствии с общепринятыми рекомендациями, лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамм KRX (Promega, США). Клоны-рекомбинанты скринировали в ПЦР и рестрикционном анализе. Целостность рамки считывания подтверждена секвенированием плазмид.

Полученные клоны-продуценты pET32a+Z-1044 и pET32a+Z-561 анализировались по уровню экспрессии после индукции в SDS-PAGE электрофорезе, при этом рекомбинантные белки были представлены бендами, отсутствующими в контролях, в области ~55–58 кДа и ~38–40 кДа, соответственно, что соответствует расчетным молекулярным массам белков. В качестве индуктора экспрессии использовали 20 %-ный раствор L-рамнозы (1:200 к жидкой среде), варьируя условия культивирования (18 °C — 18 часов, 24 °C — 16 часов, 37 °C — 2 и 4 часа). Бактериальная масса после индукции осаждалась центрифугированием, после чего осадки ресуспендировали в лизирующем буфере (ФБР + 1 % Triton X-100) и дезинтегрировали обработкой ультразвуком. Растворимость рекомбинантных белков в лизатах клеток оценивали по общепринятым методикам. Установлено, что основная часть химерного белка, содержащий фрагмент белка Е вируса Зика размером 187 а.о., находится в растворимой фракции, в то время как второй вариант рекомбинантного белка с фрагментом Е в 348 а.о. полностью нерастворим. Так как при-

менение нерастворимых рекомбинантных белков в качестве антигенов затруднительно, в виду необходимости рефолдинга, то для дальнейшей работы мы использовали клон-продуцент рЕТ32a+Z-561/5, позволяющий получить белок в растворимой форме.

Химерный белок TrxA-E очищали методом аффинной хроматографии с использованием никель-сефарозы. Конечный выход продукта составил не менее 35 мг с 1 л культуры. Полученную фракцию анализировали в белковом SDS-PAGE электрофорезе, степень чистоты препарата составила 95–98 %.

Таким образом получен хроматографически очищенный растворимый химерный белок, включающий фрагмент гликопротеина E вируса Зика. В дальнейшем планируется оценить антигенную специфичность белка с использованием положительных к панели флави-вирусов сывороток крови, и перспективность применения в качестве антигена в серологических реакциях для детекции вирусспецифических антител к вирусу Зика.

Литература

1. Melo A.S.O. et al. Внутритробное инфицирование вирусом Зика вызывает пороки развития ЦНС и микроцефалию: вершина айсберга? //Вопросы гинекологии. 2016. Т. 15. №. 1. С. 77.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Emergency Preparedness and Response: Recognizing, Managing, and Reporting Zika Virus Infections in Travelers Returning from Central America, South America, the Caribbean, and Mexico. URL : <http://emergency.cdc.gov/han/han00385.asp> (Accessed on September 1, 2016).
3. World Health Organization. WHO statement on the 2nd meeting of IHR Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. URL : <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/2nd-emergency-committee-zika/en/> (Accessed on September 1, 2016).
4. Всемирная организация здравоохранения: [Электронный ресурс] // Заявление ВОЗ о первом совещании Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в связи с виру-

сом Зика. URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/ru/>. (Дата обращения: 01.09.2016).

5. Charrel R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection // *virus*. 2016. Т. 2183. №. 3. С. 4.

6. Dupont-Rouzeyrol, M. Infectious Zika viral particles in breastmilk / M. Dupont-Rouzeyrol, A. Biron, O. O'Connor et al // *Lancet*, 2016.

ПОИСК ПЕПТИДОВ СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С CTLA-4*

SEARCH PEPTIDE SPECIFICALLY INTERACTS WITH CTLA-4

О.Н. Шапрова¹, Д.Е. Мурашкин¹, Д.В. Шаньшин², Д.Н. Щербakov²

¹ *Алтайский государственный университет*

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

O. N. Shaprova¹, D. E. Murashkin¹, D. V. Shanshin², D. N. Scherbakov²

¹ *Altai State University, Russia*

² *SRC VB «Vector», Russia*

e-mail: ngelya209@rambler.ru

Аннотация

Среди неинфекционных заболеваний человека онкологические заболевания занимают второе место среди причин смертности в мире.

Важную роль в регуляции иммунного ответа при онкологических заболеваниях может играть рецептор CTLA-4 (CD152). Данный рецептор экспонирован на поверхности Т-лимфоцитов, в то время как его лиганд В7-2 (CD86) может находиться на поверхности опухолевых клеток. Их взаимодействие позволяет опухолевым клеткам по-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00371 мол_а.

давить цитотоксичную активность Т-лимфоцитов, и тем самым избежать иммунного ответа.

Abstract

Among the non-infectious human diseases cancers are the second leading cause of mortality in the world.

An important role in the regulation of the immune response in cancer may play a receptor CTLA-4 (CD152). This receptor is exposed on the surface of T-lymphocytes, whereas its ligand B7-2 (CD86) can reside on the surface of tumor cells. The interaction allows the tumor cells to suppress the cytotoxic activity of T lymphocytes and thus avoid the immune response.

На сегодняшний день онкологические заболевания остаются одной из главных причин смертности во всем мире. Многообразие молекулярно-биологических причин возникновения опухолей является серьезной проблемой для ранней диагностики и терапии целого ряда онкологий.

Подавляющее большинство опухолей неиммуногенны, причиной, зачастую, является не отсутствие опухолеспецифических антигенов, а недостаточная их презентация на опухолевых клетках. Так при исследовании лимфоцитов периферической крови больных с подавленными иммунными реакциями было выявлено, что лимфоциты, инфильтрующие опухоль, в некоторых случаях были анергичными [1]. Одним из причин подавления цитотоксического иммунного ответа является гиперэкспрессия лиганда B7-2, который взаимодействует с маркерами CD28 и CTLA-4 — поверхностными рецепторами Т-лимфоцитов и часто обнаруживается на поверхности опухолевых клеток.

В связи с этим целью данной работы являлся поиск пептидов, специфически взаимодействующих с рецептором CTLA-4 Т-лимфоцитов, препятствующих взаимодействию с нативным лигандом B7-2.

В качестве мишени использовали химерный рекомбинантный белок CTLA-4, состоящий из Fc-фрагмента тяжелой цепи иммуноглобулина, и внеклеточного домена рецептора CTLA-4.

Для получения первоначальных данных на мишени была проведена аффинная селекция пептидов из фаговой пептидной библиотеки [3], на третьем раунде был получен элюат с концентрацией

2×10^6 БОЕ/мл. Однако анализ аминокислотных последовательностей пептидов, экспонируемых отдельными фаговыми клонами, были классифицированы как взаимодействующие с «пластиком».

Результативность аффинной селекции было решено повысить за счет негативной селекции с использованием магнитных частиц с иммобилизованным протеином G/A в качестве подложки-носителя. Данный подход позволяет сменить формат взаимодействия пептидов в составе бактериофагов с мишенью, и снизить вероятность последующей амплификации неспецифических фагов. После трех раундов аффинной селекции по данной схеме был получен элюат со значительно более низким титром бактериофагов (16×10^4 БОЕ/мл), тем не менее, последующий анализ аминокислотных последовательностей выявил наличие специфичных уникальных пептидов. Для дальнейшей характеристики 60 фаговых клонов были наработаны в препаративных количествах, после секвенирования вирусных геномов была проведена оценка специфичности связывания отобранных пептидов в составе бактериофагов в дот-блот анализе. При постановке использовали клоны, соответствующие трем группам фаготопов, бактериофаг без пептидной вставки — «К-», и бактериофаг экспонирующий фрагмент белка р24 ВИЧ-1, взаимодействующий с моноклональным антителом 29F2 — «К+». На нитроцеллюлозную мембрану наносили суспензию каждого бактериофага с биологическим титром 10^9 БОЕ/мл, после этапа блокирования мембрану инкубировали в рабочем разведении рекомбинантного белка CTLA-4. Благодаря наличию Fc-фрагмента в составе химерного CTLA-4, возможна была прямая детекция взаимодействия «пептид-мишень». По результатам дот-блот анализа было установлено, что два из трех фаготопов специфически взаимодействуют с мишенью. В дальнейшем планируется экспрессировать отобранные пептиды в составе других белков носителей и оценить пригодность полученных препаратов для иммунотерапии.

Литература

1. Ройт А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. М. : Мир, 2000. 592 с.

2. Schreiber R.D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R.D. Schreiber, L.J. Old, M.J. Smyth // Science. 2011. Vol. 331(6024). P. 1565–1570.

3. Derda R. Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification / R. Derda, Sindy K.Y. Tang, S. Cory Li, Simon Ng, W. Matochko, Mohammad R. Jafari // Molecules. 2011. № 16. P. 1776–1803.

**КОНЬЮГАЦИЯ БЕЛКА ЛАКТАПТИНА
С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА МОДИФИЦИРУЕТ
БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БЕЛКА
И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ С КЛЕТКАМИ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MDA-MB-231 ***

**LACTAPTIN CONJUGATION WITH GOLD NANOPARTICLES
MODIFIES PROTEIN BIOLOGICAL EFFECTS
AND NANOPARTICLES INTERACTION WITH BREAST
CANCER CELLS MDA-MB-231**

А. Ю. Юнусова, И. А. Пышная, О. А. Чинак

*Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

A.Yu. Yunusova, I.A. Pyshnaya, O.A. Chinak
Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS

Аннотация

Лактаптин — белок, представляющий собой фрагмент молекулы κ-казеина человека, токсичный для опухолевых клеток. Его рекомби-

* Исследование проводилось при поддержке интеграционного проекта (№94), за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 13-04-01313а).

нантный аналог (белок RL2) при конъюгации с наночастицами золота формирует устойчивые комплексы сложной формы. Эти комплексы проникают в клетки в основном с помощью кавеолин-зависимого эндоцитоза, накапливаются в структурах эндосомально-лизосомального компартмента, не разрушаются под действием лизосомальных ферментов и не оказывают токсического действия на опухолевые клетки линии MDA-MB-231.

Abstract

Lactaptin is a fragment of human κ -casein, which is capable of reducing tumor cell viability. RL2 is recombinant analog of lactaptin. Conjugation of RL2 to gold nanoparticles results in formation of stable complexes with complicated shape. These complexes enter to the cells mainly by caveolin-dependent endocytosis accumulate in the lysosomal structures, with lysosomal enzymes failing to destroy it. These complexes don't have toxic effects on tumor cells MDA-MB-231.

Лактаптин — белок, представляющий собой фрагмент молекулы κ -казеина человека, токсичный в отношении опухолевых клеток. В ИХБФМ СО РАН синтезирован его рекомбинантный аналог, белок RL2, способный вызывать гибель опухолевых клеток *in vitro*, влияя на процессы апоптоза и аутофагии. Эти свойства делают белок RL2 потенциальным терапевтическим противоопухолевым агентом. В настоящее время активно ведется изучение механизмов действия белка RL2 на опухолевые клетки. Важным этапом в понимании действия белка на клетки является выявление способа его проникновения внутрь клеток. Наиболее достоверным методом идентификации различных путей эндоцитоза (проникновения веществ в клетку) является метод электронной микроскопии. Для того, чтобы визуально проследить проникновение и «судьбу» белка RL2 в опухолевых клетках, были синтезированы конъюгаты белка RL2 с наночастицами золота (НЧЗ-RL2).

Цель данной работы: изучить характеристики конъюгатов НЧЗ с белком RL2 и выявить механизм их проникновения, локализацию в клетках и действие на клетки рака молочной железы.

Структуру наночастиц (НЧ) изучали в электронном микроскопе методом негативного контрастирования уранилацетатом (0,5 %).

Гормон-независимые клетки рака молочной железы линии MDA-MB-231 культивировали в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение суток, после чего в среду добавляли НЧЗ, НЧЗ-RL2 или белок RL2 и инкубировали 0, 5, 30 мин, 3,5 ч, 24, 48 и 72 ч. Морфологию монослоя клеток изучали в световом микроскопе Leica DM 2500 со встроенной цифровой камерой Leica DFC420 (Leica, Германия). Ультраструктурные характеристики клеток после инкубации с НЧЗ, НЧЗ-RL2 или белком RL2 изучали на ультратонких срезах с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония), оснащенного камерой бокового ввода (SIS, Германия).

Результаты

Изучение суспензии НЧЗ-RL2 в электронном микроскопе показало, что в результате конъюгации белка RL2 с НЧЗ формируются устойчивые комплексы удлиненной формы, образованные несколькими рядами НЧЗ, которые окружены гомогенным слоем белка RL2 (белковое покрытие), толщиной 2–7 нм (Рис. 1Б).

Мы планировали получить отдельные НЧЗ, покрытые белком RL2, однако, в использованных условиях конъюгации гомогенная дисперсная суспензия отдельных НЧЗ, покрытых белком RL2, не получилась, все НЧЗ сформировали агрегаты.

На ультратонких срезах проникновение белка RL2, который имеет вид рыхлого вещества зернистой структуры, не удалось обнаружить. Инкубация клеток в течение 3,5 ч с белком RL2 приводит к появлению морфологических признаков нарушения водно-солевого баланса, что свидетельствует о токсическом действии белка. Через 24 ч клетки восстанавливались после воздействия RL2.

НЧЗ и НЧЗ-RL2 проникают в клетки с различной скоростью, так НЧЗ-RL2 регистрируются в ранних эндосомах клеток уже через 5 мин инкубации, тогда как НЧЗ без покрытия в ранних эндосомах в этот же период встречаются очень редко. Ультраструктурное исследование установило использование различных видов эндоцитоза НЧЗ и НЧЗ-RL2 при проникновении в клетки, а также различный

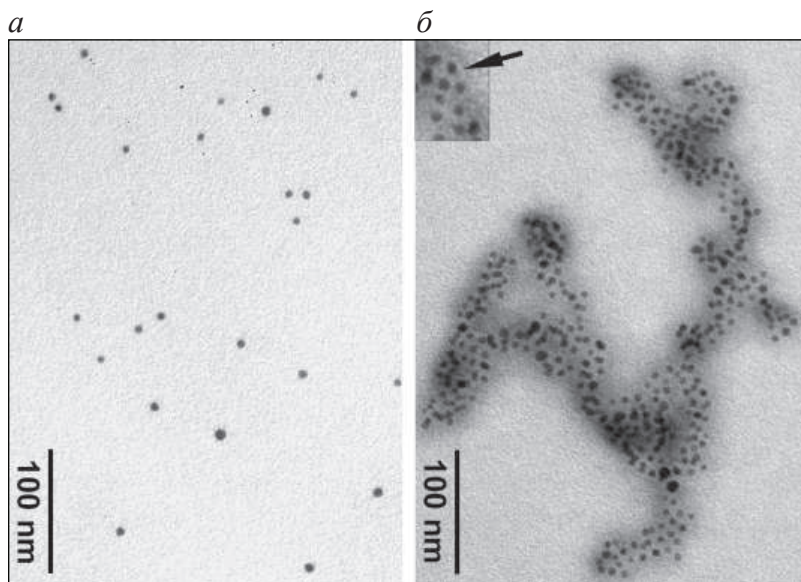


Рис. 1. *а* — наночастицы золота; *б* — комплекс наночастиц золота с белком RL2, стрелкой показано белковое покрытие RL2; негативное контрастирование уранилацетатом

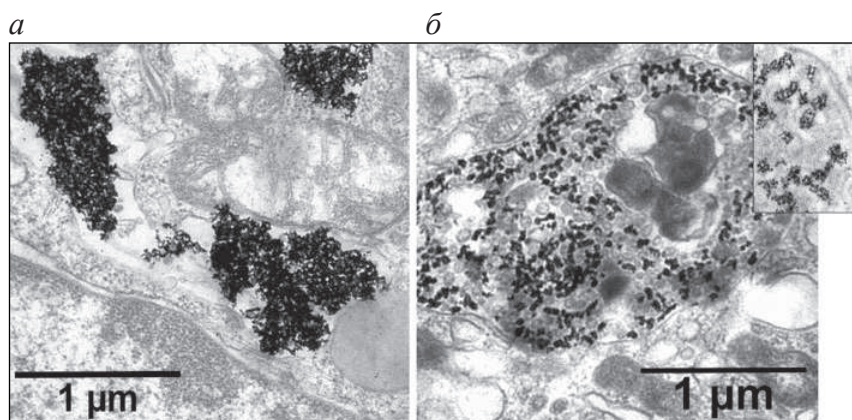


Рис. 2. Неупорядоченные плотные скопления НЧЗ в цитоплазме клетки (*а*) и отдельные комплексы НЧЗ-RL2, сохранившие свою форму, в лизосоме клетки (*б*) через 24 ч инкубации. Ультратонкие срезы

характер накопления в клетках. НЧЗ проникают в клетки преимущественно с помощью макроэндоцитоза (макропиноцитоз и фагоцитоз) и накапливаются в клетках в виде крупных, неупорядоченных скоплений, окруженных мембраной (рис. 2, *а*). Напротив, НЧЗ-RL2 в основном проникают в клетки с помощью микроэндоцитоза (главным образом кавеолин-зависимый эндоцитоз, в меньшей степени клатрин-зависимый и клатрин-кавеолин-независимый виды эндоцитоза), накапливаются в клетках в поздних эндосомах и лизосомах. Интересно, что комплексы НЧЗ-RL2 сохраняются в этих структурах, что говорит о том, что белок RL2 в комплексе с НЧЗ не разрушается под действием лизосомальных ферментов (рис. 2, *б*).

Различный характер накопления НЧЗ и НЧЗ-RL2 в клетках замечен и на светооптическом уровне. В световом микроскопе в клетках монослоя после инкубации с НЧЗ наблюдаются преимущественно плотные и крупные скопления НЧЗ (в виде черных глыбок), тогда как НЧЗ-RL2 накапливаются в цитоплазме клеток в виде более рыхлых, дисперсных скоплений.

Накопление НЧЗ и НЧЗ-RL2 в клетках не оказывало выраженного токсического действия на опухолевые клетки линии MDA-MB-231.

Заключение

— Конъюгированный с НЧЗ белок RL2 становится менее токсичным в отношении опухолевых клеток рака молочной железы линии MDA-MB-231. Накопление НЧЗ-RL2, как и НЧЗ, не вызывает выраженного специфического токсического действия на клетки линии MDA-MB-231, в отличие от белка RL2.

— Конъюгация белка RL2 с НЧЗ изменяет механизм взаимодействия частиц с клетками линии MDA-MB-231. Так, НЧЗ-RL2 проникают в клетки с помощью микроэндоцитоза и накапливаются в поздних эндосомах, тогда как НЧЗ оказываются в клетках в результате макроэндоцитоза и формируют в цитоплазме клеток крупные плотные скопления.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ «СТРОЕНИЕ —
АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ» НОВЫХ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ ОСНОВАНИЙ**

**STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF NOVEL
QUATERNARY AMMONIUM ANTIMICROBIAL COMPOUNDS**

Л. А. Яринич^{1,2,3}, В. Н. Сильников²

*¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
Новосибирск, Россия*

*² Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

*³ Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

L.A. Yarinich^{1,2,3}, V.N. Silnikov²

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

e-mail: l.yarinich@mcb.nsc.ru

Аннотация

В рамках проекта предполагается изучить зависимость «строение — антибактериальная активность» ряда новых антибактериальных препаратов на основе производных 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана. Полученные препараты были протестированы в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Нами были определены минимальные подавляющие (бактериостатические) концентрации (МПК) и минимальные бактерицидные концентрации (МБК) для каждого препарата по отношению к исполь-

зуемым шести тест-штаммам. Полученные результаты выявили зависимость между длиной алкильного заместителя 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана и антимикробной активностью соединений. Показано, что в данной серии соединений антибактериальная активность возрастает с увеличением длины алкильных заместителей в ряду C2–C12 и затем уменьшается с дальнейшим увеличением длины заместителей от C14 до C18.

Abstract

A series of new quaternary 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane derivatives was synthesized and evaluated for activity against several strains of both Gram positive and Gram negative bacteria and one strain of fungus. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against six species of microorganisms were tested. Results show a clear structure-activity relationship between alkyl chain length of substitutions of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane tertiary amine sites and antimicrobial activity. The MIC values were found to decrease with the increase of the alkyl tails chain length (from C2–C12) and again to increase at higher alkyl tails length (C14–C18).

The quaternary ammonium compounds (QACs) are a class of amphiphilic compounds consisting of a nitrogen atom with covalent bonds to four residues making the nitrogen positively charged. Recently, the variety of QACs based on 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) such as mono- and dialkylated DABCO derivatives, polycationic glycosides, DABCO units covalently attached to wool and silk surfaces were synthesized and evaluated against a series of bacteria. In this study, we extend our work on DABCO derivatives to investigate the antimicrobial activity of a series of compounds bearing alkyl tails ranging from 2 to 18 carbons in length. The positively charged DABCO motifs which are able to interact with the negatively charged bacterial cell surface, the central alkyl spacer and the alkyl tails are three structural motifs of DABCO-based QACs are expected to be responsible for antimicrobial activity.

To enhance the antibacterial activity and reduce the toxicity of compounds, we examined the structure–activity relationship. For this

purpose we prepared a series of symmetrical tetracationic DABCO-based derivatives in which two DABCO head groups are linked together through a 1,5-pentenyl spacer and bear two hydrophobic alkyl tails ranging from two to eighteen carbons in length. The compounds were tested against *B. subtilis* (ATCC #6633), and *Staphylococcus aureus* (ATCC # 25923) as Gram positive strains, *S. enterica* (ATCC # 14028), *E. coli* (ATCC # 25922), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC # 9027) as Gram negative strains, and *C. albicans* (ATCC # 32354) as the yeast-like pathogenic fungus. As can be expected, the variation of alkyl chain length exerts influence on antimicrobial activity of the synthesized tetracationic compounds. DABCO derivatives bearing the short alkyl tails (ethyl and propyl) did not reveal any antibacterial and antifungal activities.

The compounds were evaluated for their in vitro antiproliferative effect in normal and cancer cell lines. Each compound was tested on HEK293T, LMTK, RPMI8226 cell lines and MEF primary cells. All compounds showed low cytotoxicity against all cell lines (IC₅₀ ranges from 11.72 to 421 µg/ml). Generally, cytotoxicity decreases with the decrease in the length of alkyl tails of compounds. The compound bearing alkyl chains with 10 carbon atoms showed the highest cytotoxicity against RPMI8226 cell line and MEFs with IC₅₀ values of 11.72 µg/ml and 12.71 µg/ml, respectively. The cytotoxic doses of all compounds were higher than their effective doses against bacterial strains.

The influence of the length of alkyl tails in the compounds on their antimicrobial activity may be explained by the balance of hydrophobicity and solubility. In this case, with the increase of the alkyl tails length from ethyl to dodecyl, the hydrophobicity of the compounds increases that leads to stronger interactions with the inner bacterial cell membrane in addition to the electrostatic interactions the cationic DABCO head groups with the negatively charged bacterial cell surface. Given the fact that these compounds started showing antibacterial activity at alkyl chain lengths greater than 8 carbons, it is reasonable to conclude that synthesized DABCO derivatives act as amphiphilic membrane-active disruptors. The structure-activity relationship of the synthesized compounds revealed that the compounds bearing decyl and dodecyl tails were found to be most potent antimicrobial agents. Likewise, the compounds containing octyl

and nonyl tails showed clear fungicidal activity. Due to the fact that activity of QACs against different species of microorganisms varies substantially, antimicrobial activity of these compounds can not be explained only by electrostatic and hydrophobic interactions and physical disruption of the cell membranes. It seems that there are several mechanisms of action of QACs. Nevertheless specific targets have not been yet identified for most QACs. Therefore, the mechanism of the antimicrobial activity of DABCO-based QACs and specific targets of bacterial cell need further investigation.

РАЗДЕЛ 2

ВИРУСОЛОГИЯ

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ
ВАКЦИННОГО ШТАММА *B. ABORTUS* 82
И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
НА ОСНОВЕ MLVA-16****STUDY OF GENETIC STABILITY OF THE VACCINE
STRAIN *B. ABORTUS* 82 AND POSSIBILITY OF ITS
DIFFERENTIATION ON BASIS OF MLVA-16**

А. О. Амиргазин ¹, Е. С. Шевцова ¹, Т. Б. Карибаев ², А. Б. Шевцов ¹

¹ РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК,
Республика Казахстан, г. Астана

² РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии»
МСХ РК, Республика Казахстан, г. Астана

A. O. Amirgazin ¹, E. S. Shevtsova ¹, T. B. Karibaev ², A. B. Shevtsov ¹

¹ National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

² National Reference Center for Veterinary, Astana, Kazakhstan

e-mail: shevtsov@biocenter.kz

Аннотация

Вакцинация является краеугольным камнем в борьбе с бруцеллезом животных, при этом качество вакцин играет важное значение.

В работе приведены данные по оценке генетической стабильности вакцинного штамма *B.abortus* 82 с использованием MLVA-16. На протяжении 33 пассажей MLVA профиль двух культур штамма *B.abortus* 82 оставался не изменяемым. MLVA-16 вакцинного штамма *B.abortus* 82 не идентичен профилям 94 штаммов данного исследования, а также штаммам депонированных в MLVAbank.

Abstract

Vaccination is the cornerstone at struggle with brucellosis of animals, moreover, vaccine quality plays an important role. In the research represented data on the assessment of the genetic stability of the vaccine strain of *B.abortus* 82 with using of MLVA-16. During 33 passages MLVA the profile of the two cultures of the strain *B.abortus* 82 remained unchanged. MLVA-16 vaccine of strain of *B.abortus* 82 is not identical to profiles of 94 strains of this study, as well as strains deposited at MLVAbank.

В XXI веке бруцеллез продолжает занимать лидирующее положение в структуре инфекционных заболеваний животных и человека. Ежегодно регистрируется до полумиллиона впервые зарегистрированных случаев бруцеллеза [1], при этом эта цифра занижена из-за сложной диагностики, гетерогенности течения инфекции и скрытия официальных данных [2,3]. Не смотря на программы эрадикации, бруцеллез в Казахстане остается актуальной проблемой животноводства и здравоохранения. Ликвидация бруцеллеза в животноводстве является ключевым фактором благополучия населения. Важным составным элементом борьбы с бруцеллезом животных является вакцинация. На протяжении длительного времени стратегия борьбы с бруцеллезом в Казахстане сводилось к плановой вакцинации и выбраковке иммуноположительных животных. Но в 2007 году средства специфической профилактики были исключены из мер борьбы с бруцеллезом, и в основу новой стратегии вошел только принцип выявления и уничтожения иммуноположительных животных. С 2013 вакцинация животных вновь была разрешена на добровольной основе, вакцинами зарегистрированными в Казахстане (*B.abortus* S19, *B.abortus* 82, *B.abortus* RB-51, *B.melitensis* Rev1). Выбор вакцинного

препарата в настоящее время является прерогативой ветеринарного врача и владельцев животных с обязательным информированием государственной ветеринарной службы. Это вводит дополнительную нагрузку на системы ветеринарного надзора и диагностические лаборатории, в плане дифференциации привитых и больных животных, выделенных бактериальных культур и контроля вакцинных препаратов. Стандартные процедуры контроля не включают методы генетического анализа, что не позволяет установить истинность происхождения штамма и его генетическую стабильность. Ошибки в применении вакцин могут драматично усугубить сложную эпизоотологическую обстановку по бруцеллезу в Казахстане. Поэтому разработка протоколов оценки качества противобруцеллезных вакцин генетическими методами является актуальной задачей в условиях современного Казахстана. Для ряда вакцинных штаммов разработаны ПЦР протокола для дифференциации [4], что упрощает работу ветеринарных лабораторий. Однако дифференциация ряда вакцин до настоящего времени основана на фенотипических данных.

Целью данной работы являлась оценка генетической стабильности вакцинного штамма *B. abortus* 82 и оценка дискриминационной возможности MLVA-16 для дифференциации данного штамма от полевых.

В работе использовались 94 штамма *B. abortus*, выделенные на территории Казахстана. В оценке генетической стабильности использовались две культуры штамма *B. abortus* 82, одна из которых депонирована в РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии», вторая выпущена Щелковским биокомбинатом (серия 14, дата выпуска 11.14). Выделение ДНК проводили с использованием набора «DNeasy Blood Tissue Kit» (Qiagen, США). MLVA анализ и обработку данных проводили как описано ранее [5].

Мультилокусный анализ вариабельности числа tandemных повторов с использованием панели MLVA-16 был проведен для 33 пассажей двух штаммов *B. abortus* 82 и 94 эпизоотологических штаммов. Значение аллелей 16 VNTR локусов были получены для всех анализируемых штаммов. Достоверность результатов была подтверждена соответствием получаемого профиля 3-х референтных штаммов *B. abortus* 19, *B. abortus* RB51 and *B. abortus* 544. Для обо-

их штаммов *B. abortus* 82 был получен следующий MLVA профиль 4–5–3–12–2–2–3–1–6–43–8–4–8–7–3–3 который сохранился во всех пассажах. По MLVA-8 и MLVA-11 штаммы были отнесены к 36 и 72 генотипам соответственно. MLVA-16 вакцинного штамма *B. abortus* 82 не идентичен профилям штаммов данного исследования, а также штаммам депонированных в MLVAbank (<http://mlva.u-psud.fr/>) на период августа 2016 года. Самые близкие штаммы выделены в Италии, Китае и в данном исследовании, которые отличались от вакцинного штамма в локусе Bruce 07 на 1–3 повтора.

Уникальность профиля вакцинного штамма *B. abortus* 82 и высокая генетическая стабильность локусов входящих в MLVA-16 свидетельствует о возможности использования MLVA анализа в первичной идентификации вакцинных и полевых штаммов выделенных от вакцинированных животных, и проверке вакцинных препаратов. В то же время, требуется поиск альтернативных высокоспецифичных дискриминационных маркеров для данного штамма, так как ранее сообщалась о нестабильности определенных VNTR локусов при пассировании [6], кроме того стабильность при естественном селекционном давлении организма хозяина не изучалась.

Литература

1. Pappas G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, and E. V. Tsianos. The new global map of human brucellosis // *Lancet Infection Disease*. 2006. Vol. 6. P. 91–99.
2. Mantur B. G., Amarnath S. K., Shinde R. S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis // *Indian J. Med. Microbiol*. 2007. Vol. 25(3). P. 188–202.
3. Durusoy R., Karababa A. Completeness of hepatitis, brucellosis, syphilis, measles and HIV/AIDS surveillance in Izmir, Turkey // *BMC Public Health*. 2010 Feb 17;10:71. doi: 10.1186/1471–2458–10–71.
4. Lo'pez-Gon I., García-Yoldi D., Marín C. M., de Miguel M. J., Mun'oz P. M., Blasco J. M., Jacques I., Grayon M., Cloeckert A., Ferreira A. C., Cardoso R., Corre'ã de Sa M. I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for

Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains // Journal of Clinical Microbiology. — 2008. — Vol. 46. — P. 3484–3487.

5. Shevtsov A., Ramanculov E., Shevtsova E., Kairzhanova A., Tarlykov P., Filipenko M., Dymova M., Abisheva G., Jailbekova A., Kamalova D., Chsherbakov A., Tulegenov S., Akhmetova A., Sytnik I., Karibaev T., Mukanov K. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16 // Infect Genet Evol. 2015 Aug;34:173–80. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.008. Epub 2015 Jul 6.

6. Kulakov Y.K., Zheludkov M.M., Sclyarov O.D. Variable-number tandem repeat markers for identification of *Brucella abortus* 82 and 75/79-AV vaccine strains // Vaccine. 2010. Vol. 28 Suppl 5: F41–5. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.051.

ПОЛУЧЕНИЕ АДАПТИРОВАННЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1 К ЛАБОРАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МТ-4

ISOLATES OF HIV-1 ADAPTED FOR MT-4 CELL LINE LABORATORY DERIVE

П. Ю. Ачигечева, Н. В. Унагаева, Ю. В. Никонорова

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

P. Y. Achigecheva, N. V. Unagaeva, Yu. V. Nikonorova
SRC VB Vtctor, Russia

Аннотация

Получены штаммы ВИЧ-1 субтипа А (2) и CRF63_02A1 (1), адаптированные к перевиваемой клеточной линии МТ-4. Изоляты ВИЧ-1, выбранные для адаптации, выделены от лиц, инфицированных ВИЧ-1 в 2009-2012 гг. Данные генетические варианты вируса относятся к широко распространенным на территориях России ВИЧ-1,

имеют сродство к ко-рецептору CXCR4. В процессе культивирования на перевиваемой культуре клеток МТ-4 все геноварианты ВИЧ-1 показали увеличение накопления вирусного белка р24, что свидетельствует о генерализации инфекции. Адаптированные к лабораторной клеточной линии МТ-4 современные штаммы ВИЧ-1 являются наиболее подходящей моделью для проведения работ по изучению противовирусной эффективности вновь синтезированных анти-ВИЧ препаратов.

Abstract

The strains HIV-1 subtype A (2) and CRF63_02A1 (1) adapted for MT-4 cell line were derived. The isolates of HIV-1 chosen for adaption were extracted from individuals infected by HIV-1 in 2009-2012 years. These genetic variants of the virus related for HIV-1 are widely spread on Russia's territory and have affinity with CXCR4 coreceptor. All genovariats HIV-1 showed the growth of virus protein p24 which indicates generalization of infection. Modern strains HIV-1 is an appropriate model for studying antiviral effectiveness of newly synthesized anti-HIV drugs adapted for laboratory cell line MT-4.

Актуальность

Высокая степень генетической гетерогенности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) способствует быстрому возникновению изолятов, устойчивых к противовирусным препаратам. Использование мононуклеаров периферической крови (МПК) для первичного тестирования ати-ВИЧ препаратов является достаточно трудоемким и затратным методом. Перевиваемые клеточные линии становятся наиболее подходящей моделью для проведения таких исследований, а также для сравнительного изучения биологических особенностей современных эпидемиологически значимых вариантов ВИЧ-1. Анализ распространения генетических вариантов вируса в России показывает, что лидирующее место по распространенности в настоящее время занимают субтип А и циркулирующая рекомбинантная форма (circulating recombinant forms) CRF63_02A1 ВИЧ-1.

Цель исследования

Получение адаптированных изолятов ВИЧ-1 к лабораторной *клеточной линии* МТ-4.

Материалы и методы

Для адаптивирования вариантов ВИЧ-1 в работе использовались 3 выделенных от ВИЧ-инфицированных лиц изолята ВИЧ-1: субтипа А (2) и CRF63_02A1 (1), имеющие сродство к ко-рецептору CXCR4. Культивирование изолятов ВИЧ проводили на моноклониальных периферических крови (МПК), полученных от двух здоровых доноров. Инкубацию клеточных культур осуществляли в течение 3-х дней в атмосфере 5 % CO₂ при 37°C; в полной ростовой среде (RPMI-1640, 20 % сыворотки плода коровы, 2 mM L-глутамина, 20 мкг/мл гентамицина, фитогемагглютинин (ФГА) 5 мкг/мл). Затем к МПК добавляли клеточную суспензию культивируемых изолятов ВИЧ-1. Сокультивирование проводили согласно протоколу ВОЗ. Репродукцию ВИЧ-1 в пробах оценивали на 4, 7 сутки по приросту концентрации вирусного антигена — белка p24 в культуральной жидкости, которую определяли с помощью иммуноферментного анализа набором «ВИЧ-1 p24-антиген-ИФА-БЕСТ». Данный набор позволяет выявить и количественно оценить содержание p24 в пробах культуральной жидкости. Культуральную жидкость из проб с культивируемыми изолятами ВИЧ-1, показавшими прирост p24 более, чем в 100 раз, использовали для заражения суспензионной клеточной линии МТ-4, находящейся в стадии логарифмического роста. Культура МТ-4 представляет собой перевиваемую линию Т-клеток человека, характеризующуюся высокой чувствительностью к ВИЧ-1, которая была получена при совместном культивировании лимфоцитов из крови сердца и периферической крови больных Т-клеточной лейкемией. Перевиваемая линия имеет мелкие лимфобластоидные круглые клетки с крупными ядрами неправильной формы, занимающие основную часть клетки.

МТ-4 сокультивировали с инфицированными МПК изолятами ВИЧ-1 (1 пассаж). Адаптация проходила в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C, в полной ростовой среде (RPMI-1640, 20 % сыворотки плода коровы, 20 мкг/мл гентамицина). На 4, 7, 9, 11 сутки осуществляли визуальный осмотр под микроскопом, оценивая цитопатическое

действие вируса на МТ-4 (наличие синцитиев, цитодеструкции клеток), и проводили сбор образцов для определения накопления р24. После проведения ИФА и оценки содержания вирусного антигена осуществляли 2 пассажа — сокультивировали незараженную линию МТ-4 с инфицированными изолятами МТ-4 с достаточной для заражения концентрацией вирусного белка. Каждые три дня визуально оценивали деструктивное действие вируса на МТ-4 и собирали пробы культуральной жидкости для определения наличия ВИЧ-1 и анализа уровня репродукции ВИЧ в клеточной линии МТ-4.

Результаты и обсуждение

По мере развития ВИЧ-инфекции в организме человека (*in vivo*) наблюдается смена ко-рецепторов, обеспечивающих проникновение вируса в клетку с CCR5 (на начальных стадиях инфекции) на CXCR4. Вирусы, использующие в качестве основного ко-рецептора CXCR4, выявляются на поздних стадиях инфекции. По этой причине наилучшим вариантом для адаптации на перевиваемой клеточной линии МТ-4, экспрессирующей только CXCR4 ко-рецепторы, являются ВИЧ-1, имеющие CXCR4 тропность. В этой связи сотрудниками отдела ретровирусов при мониторинге за циркулирующими на территориях России ВИЧ-1 проводилось исследование тропности ВИЧ-1 с целью поиска вариантов вируса, имеющих родство к CXCR4 ко-рецептору. Такие ВИЧ-1 субтипа А и CRF63_02A1 ВИЧ-1 были найдены и переданы для получения адаптированных изолятов ВИЧ-1.

В процессе адаптации изолята CRF63_02A1 и 2-х изолятов субтипа А ВИЧ-1 к суспензионной клеточной линии МТ-4 было выявлено увеличение накопления вирусного белка р24 во всех пробах уже после 2 пассажа, что отражает процесс продуктивной инфекции вирусных вариантов на МТ-4. В течение 6 суток был зарегистрирован прирост р24 в пробах первого изолята ВИЧ-1 субтипа А с 2890 пг/мл (0 часов) до 852400 пг/мл (6 сут). Для второго изолята субтипа А наблюдалось увеличение белка р24 с 14,2 нг/мл (0 часов) до 17690 нг/мл (9 сут). Размножение ВИЧ-1 субтипа А сопровождалось цитопатическим действием на МТ-4, образованием синцитиев, пикнотически окрашенных клеток. В культуре наблюдалось большое количество дебриса. Сокуль-

тивирование изолята CRF63_02A1 ВИЧ-1 показало прирост р24 на 6 сутки от 6430 пг/мл (0 часов) до 589000 пг/мл (6 сут).

Выводы

Получены адаптированные к перевиваемой клеточной линии МТ-4 инфекционные изоляты актуальных для России генетических вариантов субтипа А и CRF63_02A1ВИЧ-1. Адаптированные изоляты ВИЧ-1 будут использованы как для сравнительного изучения субтип-специфических свойств вирусов, так и для тестирования новых перспективных препаратов на эффективность ингибирования репродукции ВИЧ-1.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1, ВЫДЕЛЕННЫХ В АРАЛЬСКОМ РЕГИОНЕ В 2015–2016 ГГ.

THE SENSITIVITY OF THE STRAINS OF INFLUENZA A/H1N1 VIRUS, ISOLATED IN THE ARAL SEA REGION IN 2015–2016, TO THE ANTIVIRAL DRUGS

А. М. Баймухаметова, М. К. Қалқожаева, Г. В. Лукманова,
Т. И. Глебова, Н. Г. Кливлеева

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

A. M. Baimukhametova, M. K. Kalkozhayeva,
G. V. Lukmanova, T. I. Glebova, N. G. Klivleyeva
Institute of Microbiology and Virology-CS MES, Republic of Kazakhstan

e-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

Представлены результаты изучения чувствительности девяти казахстанских штаммов вируса гриппа А/Н1N1, выделенных в Араль-

ском регионе в 2015–2016 гг., по отношению к ремантадину и тамифлю. Показано, что практически все изученные штаммы проявили чувствительность к противовирусным препаратам.

Abstract

There are the results of the research of the sensitivity of nine strains of influenza A/H1N1 virus, isolated in the Aral Sea Region in 2015 — 2016, to rimantadine and tamiflu. The almost all of the strains showed the sensitivity to the antiviral drugs.

В настоящее время широкий спектр лекарственных средств, используемый при гриппе и ОРВИ, отличается разнообразием и охватывает всевозможные способы влияния на инфекционный процесс. Наиболее распространенными противогриппозными препаратами во всем мире являются химические соединения двух групп: производные адамантана (ремантадин и амантадин) и ингибиторы нейраминидазы (тамифлю и реленза).

Высокий потенциал вируса гриппа к изменчивости обуславливает быстрое распространение вирусов с генетическими признаками резистентности к применяемым лекарственным средствам. Изучение чувствительности к противовирусным препаратам является актуальным направлением вирусологических исследований.

При исследовании 372 носоглоточных смывов, собранных в эпидемический сезон 2015–2016 гг. в лечебных учреждениях Кызылординской и Актюбинской областей, на куриных эмбрионах выделено девять гемагглютинирующих агентов, идентифицированных в реакции торможения гемагглютинации, реакции ингибиции нейраминидазной активности и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени как вирусы гриппа A/H1N1.

Целью настоящей работы являлось изучение чувствительности девяти казахстанских штаммов вируса гриппа A/H1N1 к различным концентрациям противовирусных препаратов (ремантадин и тамифлю), которая оценивалась по уровню подавления репродукции 100 ЭИД₅₀ вируса. Дозу препарата, подавляющую титр вируса в реакции гемагглютинации в два раза по сравнению с контролем (без препарата), считали ингибирующей концентрацией.

Установлено, что значения ингибирующей концентрации для тамифлю по отношению к шести казахстанским вирусам составляли от 1,56 до 6,25 мкг/мл. Для штаммов эти показатели были выше и достигали 12,5 мкг/мл. Полученные значения входили в диапазон концентраций к тамифлю для различных штаммов вирусов гриппа А, оцениваемых как чувствительные к данному препарату.

Казахстанские вирусы гриппа по отношению к ремантадину отнесены к восприимчивым, так как показатели составили 3,12 — 12,5 мкг/мл, за исключением одного штамма, резистентного к препарату.

Таким образом, установлено, что вирусы гриппа А/Н1N1, выделенные в Аральском регионе в 2015–2016 гг., являются чувствительными по отношению к исследуемым препаратам, кроме одного вируса — устойчивого к ремантадину.

ТЕРМОФИЛЬНЫЙ БАКТЕРИОФАГ AP45: СВОЙСТВА, АНАЛИЗ ГЕНОМА, ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ

THERMOPHILIC BACTERIOPHAGE AP45: PROPERTIES, GENOME ANALYSIS, LIFE CYCLE

О. В. Боковая, В. В. Морозова, Ю. Н. Козлова

*ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

O. V. Bokovaya, V. V. Morozova, Yu. N. Kozlova
ICBFM SB RAS, Russia

e-mail: bokovaya.o.v@gmail.com

Аннотация

Термофильный бактериофаг AP45 и его бактерия-хозяин КЭМТК 656 были выделены из образцов почвы Долины Гейзеров на Камчатке.

Хозяин был классифицирован как вид *Aeribacillus pallidus*. Бактериофаг AP45 был причислен к семейству Siphoviridae. Фаг термостабилен при 55–65°C, жизнеспособен при 75–85°C и продуцирует термостабильный белок-эндолизин. Размер генома составил 51 т.н.п. Выявлено 73 ОПТ, из которых 40 кодируют белки с неизвестными функциями. Наибольшее сходство геномов (36 %) было обнаружено с термофильным фагом D6E [GU568037]. Большинство ОПТ неструктурных белков фага AP45 сходны с ОПТ организмов семейства Bacillaceae. Была обнаружена способность к лизогенному пути развития.

Abstract

Thermophilic bacteriophage AP45 and its host-bacterium CEMTC 656 were isolated from soil samples of Valley of Geizers from Kamchatka. The host was classified as species *Aeribacillus pallidus*. Bacteriophage AP45 was identified as a member of the family Siphoviridae. Phage is thermostable at 55–65 ° C and viable at 75–85 ° C and produces thermostable protein-endolysin. Genome size is 51606 bp and it contains 73 ORFs, 40 of which encode proteins with unknown functions. The highest similarity (36 %) among the genomic sequences of bacteriophages was founded in the cluster of structural proteins with thermophilic phage D6E [GU568037]. Most ORFs among non-structural proteins of phage AP45 were similar to ORFs of the family Bacillaceae organisms. The ability to lysogenic development was discovered.

Термофильный бактериофаг AP45 и его термофильный микроорганизм-хозяин КЭМТК 656 были выделены из почвенных образцов Долины Гейзеров на Камчатке.

Культура-хозяин была идентифицирована как термофильная бактерия вида *Aeribacillus pallidus* методом филотипирования по последовательности гена 16S рРНК. При этом в исходной культуре присутствовали два штамма, которые сильно различались морфологически и по набору биохимических активностей.

При визуализации структуры вириона бактериофага методом электронной микроскопии бактериофаг AP45 был отнесен к семейству Siphoviridae.

Бактериофаг обладает следующими биологическими свойствами: на газоне чувствительной культуры продуцирует бляшки размером 0,5–1 мм и широкую зону лизиса за счет продукции растворимого белка-эндолизина, разрушающего клеточные стенки бактерий. Фаг термостабилен при 55–65° С, сохраняет жизнеспособность при температуре 75–85° С, чувствителен к хлороформу. Константы скорости адсорбции бактериофага на клетках штаммов отличаются и составляют $K_1 = 1,58 \times 10^{-7} \pm 0,01$ мл/мин, $K_3 = 8,45 \times 10^{-8} \pm 0,15$ мл/мин, соответственно.

Размер генома по данным полногеномного секвенирования составил 51606 н.п. Анализ полученной последовательности выявил 73 предполагаемых ОРТ. Геном содержит ОРТ, кодирующие белки рекомбинации и регуляции метаболизма ДНК, белки лизиса бактериальной клетки, структурные белки, а также 40 ОРТ, кодирующих белки с неизвестными функциями, которые, вероятно, имеют уникальные функции. Геном бактериофага не содержит ДНК- и РНК-полимераз, то есть для своего воспроизводства фаг использует бактериальные полимеразы. Наибольшее сходство (36 %) среди геномных последовательностей бактериофагов было обнаружено с термофильным фагом D6E [GU568037] в кластере структурных белков. Большинство ОРТ неструктурных белков фага AP45 имеют сходство с ОРТ термофильных микроорганизмов, относящихся к семейству *Bacillaceae*, что свидетельствует о том, что имело место коэволюционное развитие бактерий-хозяев и бактериофагов.

Способность к лизогенному пути развития была предположена благодаря наличию нескольких белков рекомбинации и подтверждена индукцией выхода профага из резистентных клеток культуры 656. Литический путь развития бактериофага обусловлен наличием в геноме ОРТ, кодирующих белки-эндолизины, которые используются для выхода новых фаговых частиц из клетки.

Таким образом, впервые был охарактеризован бактериофаг, специфичный к термофильной бактерии *Aeribacillus pallidus*, выделенной из камчатского термофильного сообщества. Бактериофаг относится к умеренным термофилам. Фаг AP45 способен как к литическому, так и к лизогенному путям развития. Для последовательностей, ко-

дируемых неструктурными ОРТ фага, не обнаружено аналогичных последовательностей бактериофагов в существующих базах данных.

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСМИССИВНОСТИ ВИРУСА ГРИППА С ПАНДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

THE DEVELOPMENT OF LABORATORY DEVICE FOR STUDING OF INFLUENZA VIRUS TRANSMISSIBILITY WITH PANDEMIC POTENTIAL

А. С. Гудымо, Н. В. Данильченко, В. Ю. Марченко, Н. И. Гончарова,
О. Г. Пьянкова, И. М. Суслопаров, С. В. Мальцев, О. С. Таранов,
А. Б. Рыжиков

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

A. S. Gudymo, N. V. Danilchenko, V. Y. Marchenko, N. I. Goncharova,
O. G. Pyankova, I. M. Susloparov, S. V. Maltsev, O. S. Taranov,
A. B. Ryzhikov
SRCVB «Vector», Russia

Аннотация

В данном исследовании была произведена разработка лабораторной установки для изучения трансмиссивности вируса гриппа с пандемическим потенциалом, на примере вируса A/rook/Chany/32/2015 (H5N1). Модельными животными являлись морские свинки, выдыхаемый воздух которых на 1, 2 и 3 сутки фильтровался на установке через аэрозольный аналитический фильтр (АФА-БА-3) и также ежедневно брались смывы из носа для сравнения результатов. Титр вируса оценивали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты показывают, что

максимальная концентрация вируса в смывах достигалась на второй день после заражения и далее резко снижалась на третьи сутки. Аналогичные результаты по концентрации вируса получились на фильтрах экспериментальной лабораторной установки. Показана работоспособность и пригодность разработанной установки для изучения трансмиссивности вируса гриппа с пандемическим потенциалом.

Abstract

This study was performed to develop a laboratory setup for studying the transmissibility of influenza virus with pandemic potential, on the example of the virus A / rook / Chany / 32/2015 (H5N1). Animal models were the guinea pigs, the exhaled air was tested on days 1, 2 and 3 by analytical aerosol filter (AFA-BA-3) and also daily swabs were taken from the nose of guinea pig to compare the results. The viral titer was evaluated by RT-PCR with the detection in real time. The results indicate that the maximum concentration of the virus in the washings was achieved on the second day after infection and then sharply declined for the third day. Similar results were obtained for the concentration of the virus on filters. The efficiency and suitability of the developed systems for studying the transmissibility of influenza virus with pandemic potential was approved.

Введение

Сегодня, наряду с уже повсеместно циркулирующими штаммами, потенциальную угрозу пандемии несут высоко патогенные вирусы гриппа птиц, которые уже преодолели видовой барьер, передаваясь от птиц к человеку. В дальнейшем могут произойти новые генетические изменения, которые позволят птичьим вирусам передаваться уже непосредственно от человека к человеку.

Три основных свойства вируса гриппа определяют его пандемические потенции: новизна штамма для иммунной системы, способность связываться с рецепторами клеток ВДП человека и способность передаваться между организмами, то есть трансмиссивность. Именно степень трансмиссивности циркулирующих штаммов определяет тяжесть вызываемых ими пандемий или эпидемий. К примеру,

для оценки риска возникновения пандемического гриппа используют такой оценочный инструмент как TIPRA (см. табл.).

Элементы оценки риска возникновения пандемического гриппа

Элементы оценки риска	Вес элемента
Способность связываться с рецепторами	0.408
Передача между модельными животными (трансмиссивность)	0.242
Наличие случаев инфицирования человека	0.158
Генетические характеристики	0.103
Эпидемии у животных	0.061
География распределения инфекции у животных	0.028

Хотя трансмиссивность вирусного штамма среди всех факторов пандемического риска стоит на втором месте, она, тем не менее, существенно зависит от способности вируса связываться с рецепторами. Оба этих фактора в совокупности на 65 % влияют на риск возникновения пандемического штамма вируса гриппа. Таким образом, существует насущная необходимость глубокого понимания процесса трансмиссивности вируса гриппа и ее количественного измерения.

Цель данной работы — разработка лабораторной установки для количественного измерения трансмиссивности вируса гриппа с пандемическим потенциалом.

Принципиальная схема лабораторной установки для изучения трансмиссивности вируса гриппа на морских свинках представлена на рис. 1.

Схема эксперимента и результаты

Модельными животными для проведения эксперимента являлись морские свинки. Всего в работе было использовано 4 морские свинки, весом 200–250 г. Экспериментальным животным было проведено интраназальное заражение гриппом A/gook/Chany/32/2015 (H5N1) в дозе 5,0 lgЭИД₅₀. На 1, 2 и 3 сутки от начала эксперимента у всех животных брали носовые смывы (в 1,0 мл среды), а также проводили продув (1 ч.) выдыхаемого морскими свинками воздуха на фильтр в исследуемой

экспериментальной установке (рис. 1). Объемная скорость воздушного потока через фильтр — 10 л/мин. Концентрацию вируса в смывах и на фильтрах измеряли методом ПЦР.

Результаты, приведенные на рис. 2, показывают, что в течение первых суток после заражения вирус в смывах носовой полости не обнаруживается, на вторые сутки после заражения достигается

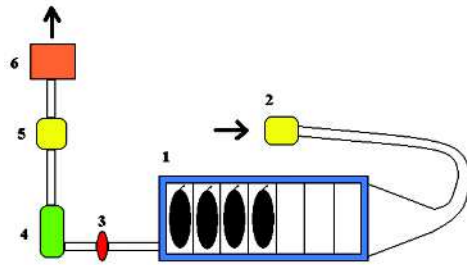


Рис. 1. Принципиальная схема лабораторной установки: 1 — камера для животных, 2 — фильтр для забора чистого воздуха, 3 — аналитический фильтр для забора выдыхаемого свинками воздуха, 4 — критическое сопло, 5 — фильтр для очистки воздуха, 6 — насос

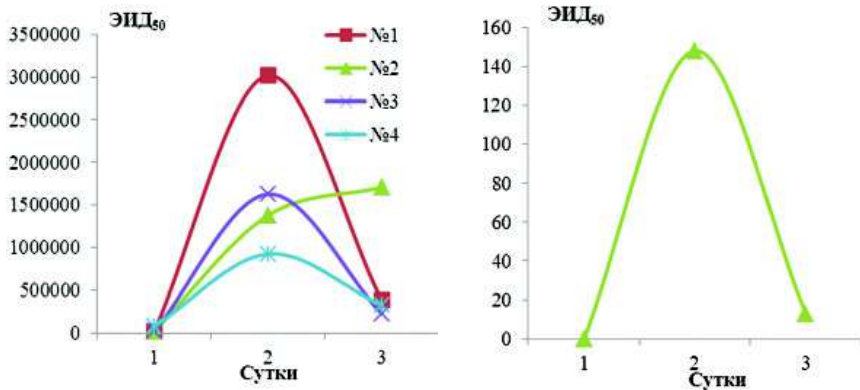


Рис. 2. Измерение концентрации вируса в смыве из носовой полости морских свинок и в выдыхаемом воздухе: а — титр вируса в носовых смывах каждой из 4-х морских свинок; б — титр вируса на фильтре

максимальная концентрации вируса в смывах и далее на третьи сутки резко снижается. Аналогичная колоколообразная картина кинетики вируса в выдыхаемом воздухе зараженных животных наблюдалась при измерении смывов с фильтров.

На 3-и сутки после заражения животные были подвергнуты эвтазии и произведено взятие образцов (среза) тканей верхних дыхательных путей. Было установлено, что инфицированию подверглись 50 % клеток слизистой.

Выводы

1. Разработана лабораторная установка для изучения на морских свинках трансмиссивности вируса гриппа с пандемическим потенциалом.
2. Показана принципиальная возможность количественного измерения трансмиссивности вируса гриппа на морских свинках

ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРЕЦОВ РОДА *CULICOIDES* НА ТЕРРИТОРИИ СМОЛЕНСКОЙ И КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

INVESTIGATION *CULICOIDES* MIDGES ON THE TERRITORY OF SMOLENSK AND KALUGA REGIONS

А. Ю. Кольцов, Н. И. Сальников, Д. В. Колбасов

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии*

A. Y. Koltsov, N. I. Salnikov, D. V. Kolbasov
National Research Institute of Veterinary Virology
and Microbiology of Russia

e-mail: kolcov.andrew@gmail.com

Аннотация

Вспышки блютанга, ранее экзотического заболевания, неоднократно отмечались на территории России. Вирус блютанга «сохраня-

ется» в природе в бесконечной серии чередующихся циклов репликации в мокрецах рода *Culicoides* и в различных видах жвачных млекопитающих. В нашей стране обитают несколько видов переносчиков вируса блютанга, что свидетельствует о возможности возникновения эндемичных очагов инфекции. После вспышки блютанга в Смоленской области в 2011 г. на территории Смоленской и Калужской областей были собраны мокрецы рода *Culicoides*. С помощью молекулярных маркеров установлена их видовая принадлежность. Кроме того, продемонстрировано наличие генома вируса блютанга 14 серотипа в пулах собранных насекомых.

Abstract

The outbreaks of bluetongue have been noted repeatedly in the territory of Russia. BTV is maintained in nature by an endless series of alternating cycles of replication in *Culicoides* midges and various mammalian ruminant species. The some bluetongue virus vector species of *Culicoides* were identified in Russian Federation, indicating the possibility of the appearance of endemic territory of infection in our country. After the outbreak of bluetongue in the Smolensk region in 2011, *Culicoides* midges were collected on the territory of Smolensk and Kaluga regions. PCR method was used for identification of members of the *Culicoides* midges. In addition, we demonstrated of the presence of the virus genome (serotype 14) in pools of the collected insects.

Блютанг или катаральная лихорадка овец — вирусная трансмиссивная инфекция, передающаяся кровососущими насекомыми рода *Culicoides*, характеризуется лихорадочным состоянием воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, особенно языка, пищеварительного тракта, эпителия венчика и дегенеративными изменениями скелетных мышц. Заболевание вызывает вирус блютанга (ВБ), входящий в состав рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*. Генетически ВБ высоко гетерогенен, по данным на 2016 г. зафиксировано 27 серотипов вируса.

В последние десятилетия наблюдается тенденция к расширению ареала трансмиссивных инфекций, в том числе и блютанга,

что делает актуальным вопрос изучения, как возбудителей данных болезней, так и их переносчиков. Сложившаяся ситуация усугубляется мировым изменением климатических условий, способствующих распространению векторов-переносчиков на новые территории и увеличению численности насекомых. Следствием этого может быть проникновение патогенов в умеренные климатические пояса обоих полушарий и рост количества вспышек в эндемических очагах.

Вирус блютанга «сохраняется» в природе в бесконечной серии чередующихся циклов репликации в насекомых рода *Culicoides* и в различных видах жвачных млекопитающих. Эксперименты показали, что способность вируса инфицировать мокрецов рода *Culicoides* и передаваться ими ограничена относительно небольшим числом видов. Таким образом, карта распространения блютанга будет практически совпадать с ареалом распределения восприимчивых насекомых. Из выявленных или предполагаемых переносчиков вируса блютанга в России обитают, по меньшей мере, 7 видов (*C. pulicaris*, *C. impunctatus*, *C. obsoletus*, *C. dewulfi*, *C. scoticus*, *C. nubeculosus*, *C. stigma*), что свидетельствует о возможности возникновения эндемичных очагов инфекции в нашей стране.

Актуальность изучения возбудителя блютанга постоянно «подогревается» выявлением инфицированного вирусом импортированного или местного скота на территории России. Так, при исследовании импортированного из Германии, а затем и местного скота из Смоленской и Калужской областей в 2011 году были выявлены инфицированные животные. Выделенный вирус был типирован методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени как 14 серотип ВБ.

В связи с тем, что мониторинговые исследования, проведенные среди крупного и мелкого рогатого скота Смоленской и Калужской областей, продемонстрировали широкое распространение вируса среди поголовья, целью нашей работы являлось выявление на данной территории и исследование потенциальных переносчиков — кровососущих мокрецов рода *Culicoides*.

Отлов мокрецов и отбор проб крови проводили в весенне-осенний период в 2011–2012 годах, в радиусе 5, 20 и 35 км от точки ло-

кализации инфицированных вирусом блютанга животных. Дополнительно выполнили случайную выборку животных из 9 стад крупного и 5 стад мелкого рогатого скота, расположенных на большом расстоянии от точки отсчета — 300 км.

Насекомых собирали с помощью световых ловушек, развешанных у помещений с животными на тех же фермах, где были выявлены инфицированные или серопозитивные животные. Всего было собрано более 5000 мокрецов рода *Culicoides*.

Определение видовой принадлежности мокрецов *C. pulicaris* complex (*C. pulicaris* s.s., *C. punctatus*, *C. impunctatus*, *C. griseus* and *C. newsteadii*) проводили согласно методике, предложенной Nolan, D.V. et al., 2007. Выявление и типирование вируса блютанга проводили с использованием разработанных нами тест-систем на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

В результате проведенных исследований были выявлены 4 вида мокрецов (*C. pulicaris* s.s., *C. punctatus*, *C. impunctatus* и *C. griseus*) входящих в комплекс *C. Pulicaris*. Кроме того, в 3 пулах насекомых был обнаружен геном ВБ.

Таким образом, установлено присутствие на территории Смоленской и Калужской областей мокрецов *C. pulicaris* complex, потенциальных переносчиков вируса блютанга. Кроме того, наличие положительного результата ОТ-ПЦР при исследовании обнаруженных на данных территориях мокрецов рода *Culicoides* может свидетельствовать о персистенции вируса блютанга среди популяций данных насекомых. По данным Россельхознадзора в 2015 году в Смоленской области также были зарегистрированы случаи положительной серодиагностики среди местного скота. Что подтверждает вовлеченность местных видов мокрецов в инфекционный процесс. А также говорит о том, что необходимы повторные исследования по изучению видового состава мокрецов рода *Culicoides*, на территории данных областей.

**ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТИВООСПЕННОГО
ХИМИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НИОХ-14**

**EVALUATION OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF
ANTI-SMALLPOX CHEMICAL COMPOUND NIOCH-14**

О. Ю. Мазурков ¹, А. С. Кабанов ¹, М. О. Скарнович ¹, Н. И. Бормотов ¹,
М. А. Скарнович ¹, О. А. Серова ¹, Л. Н. Шишкина ¹, А. А. Чернонос ²

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

² *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной ме-
дицины Сибирского отделения Российской академии наук*

O. Yu. Mazurkov ¹, A. S. Kabanov ¹, M. O. Skarnovich ¹, N. I. Bormotov ¹,
M. A. Skarnovich ¹, O. A. Serova ¹, L. N. Shishkina ¹, A. A. Chernonosov ²

¹ SRC VB "Vector", Russia

² ICBFM SB RAS, Russia

Аннотация

При исследовании фармакокинетических показателей нового химически синтезированного соединения НИОХ-14 в экспериментах на мышах была продемонстрирована его хорошая биодоступность при пероральном применении.

Abstract

In the investigation of pharmacokinetic parameters of a new chemically synthesized compound NIOCH-14 in mice its good oral bioavailability was demonstrated.

Актуальность. Ортопоксвирусы могут вызывать у людей спектр заболеваний в широком диапазоне клинических проявлений: от серьезных диссеминированных повреждений в случае заражения вирусом

натуральной оспы (ВНО) до локальных повреждений при инфекции, вызванной вирусом оспы коров. После завершения программы «глобальной ликвидации оспы» на Земле и отмены вакцинации против оспы в 1980 году, в мире сложилась опасная ситуация, когда более половины людей на планете не имеет иммунитета против ортопоксвирусных инфекций. Недавно в США был разработан противооспенный препарат ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид). Совместно с Новосибирским институтом органической химии Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) нами было получено новое химическое соединение НИОХ-14 (7-[N'-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота), обладающее, как ранее нами было показано, сравнимой с ST-246, активностью в отношении ортопоксвирусов.

Цель исследования

Изучение фармакокинетических показателей противооспенного химического соединения НИОХ-14 в экспериментах на мышах.

Материалы и методы. В экспериментах использовались аутбредные мыши ICR обоего пола массой 18–20 г. Препарат НИОХ-14 вводили мышам в дозах 10 и 50 мкг/г массы мыши однократно перорально в 0,2 мл раствора метилцеллюлозы с твином-80. Через 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 и 48 ч эвтаназировали по 6 мышей и производили забор крови (для получения сыворотки). Затем в образцах сыворотки крови мышей определяли концентрацию метаболитов НИОХ-14: активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К.

НИОХ-14 не растворяется в воде и в растворителях, обычно используемых в масс-спектрометрии (ацетонитрил, спирты). Для построения калибровочных кривых НИОХ-14 растворяли в 10 % ДМСО в ацетонитриле. В таком растворителе НИОХ-14 превращается в активный метаболит ST-246.

Для оценки показателя абсолютной биодоступности (F_{abs}) препарата необходимо получить параметры его фармакокинетики при внутривенном (в/в) введении. С этой целью мышам однократно в/в вводили субстанцию НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г в 0,1 мл раствора, содержа-

шем 2 % ДМСО, 50 % ПЭГ-400, 20 % метанола и 1 % твин-80. Через 0,25, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 24 ч после в/в введения препарата эвтаназировали по 6 мышей и производили забор крови. Затем в образцах сыворотки крови определяли концентрацию метаболитов НИОХ-14: активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К.

Определение фармакокинетических параметров активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К в сыворотке крови и гомогенатах органов мышей осуществляли с помощью масс-спектрометрического анализа, который проводили в режиме MRM (multiple reaction monitoring) с регистрацией переходов ионов соответствующих определяемым веществам (от иона предшественника к иону-продукту): 375→283 m/z (ST-246), 189→145 m/z (метаболит К), 337→245 m/z (N-98). Концентрация внутреннего стандарта N-98 в сыворотке крови мышей составляла 500 нг/мл.

Определяли следующие фармакокинетические параметры:

1. $T_{1/2}$ (ч) — время полувыведения, в течение которого концентрация вещества в крови снижается на 50 %.

2. $T_{\max}$ (ч) — время достижения максимальной концентрации вещества в крови.

3. $C_{\max}$ (нг/мл) — максимальная концентрация вещества в крови.

4. AUC_{0-t} (ч×нг/мл) — площадь под кривой «концентрация — время» в крови в интервале от момента введения до времени t , прошедшего после введения вещества, или от 0 до ∞ ($AUC_{0-\infty}$).

5. $AUMC_{0-t}$ (ч²×нг/мл) — площадь под кривой момента; произведение AUC_{0-t} на время t , прошедшее от момента введения вещества, или от 0 до ∞ ($AUMC_{0-\infty}$).

6. MRT (ч) — среднее время удерживания, которое вещество находится в крови: $MRT = AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}$.

7. F_{abs} — абсолютная биодоступность, часть вещества, которая достигла системного кровотока: $F_{\text{abs}} = (AUC_{\text{п/о}} \times D_{\text{в/в}}) / (AUC_{\text{в/в}} \times D_{\text{п/о}})$; где $AUC_{\text{п/о}}$ — площадь под кривой «концентрация — время» от 0 до t в сыворотке крови при пероральном (п/о) введении препарата, $AUC_{\text{в/в}}$ — площадь под кривой «концентрация — время» от 0 до t в сыворотке крови при внутривенном (в/в) введении препарата, $D_{\text{п/о}}$ и $D_{\text{в/в}}$ — дозы препарата соответственно при п/о и в/в введении.

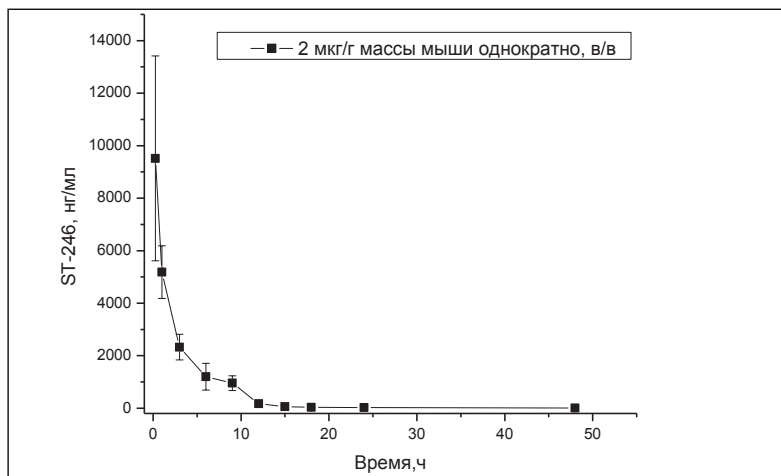


Рис. 1. Изменение концентрации ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени введения препарата НИОХ-14 в форме субстанции. Однократное внутривенное введение 2 мкг/г субстанции НИОХ-14 (■). Значения в каждой точке представлены как $M \pm SM$

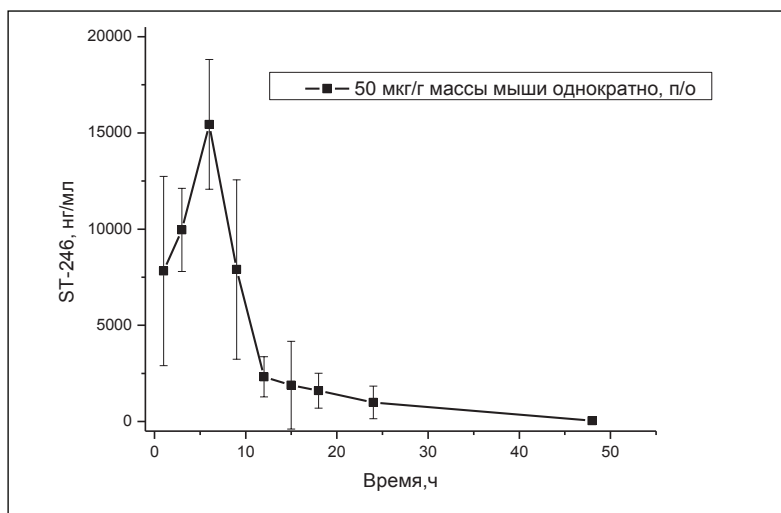


Рис. 2. Изменение концентрации ST-246 в сыворотке крови мышей в зависимости от времени введения препарата НИОХ-14 в форме субстанции. Однократное пероральное введение 50 мкг/г субстанции НИОХ-14 (■). Значения в каждой точке представлены как $M \pm S_M$

Результаты исследования. Проведена и представлена сравнительная оценка фармакокинетических параметров активного метаболита НИОХ-14 (ST-246) в сыворотке крови мышей, получавших перорально НИОХ-14 в дозах 10 и 50 мкг/г массы мыши, и мышей, получавших внутривенно НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г массы мыши (рис. 1 и 2, таблица). Показано, что абсолютная биодоступность (F_{abs}) НИОХ-14 при его пероральном введении в дозе 10 мкг/г массы мыши составляла 39,2 %, а в дозе 50 мкг/г массы мыши — 22,8 %.

Заключение. Таким образом, фармакокинетические параметры соединения НИОХ-14, полученные по результатам исследования показателей его активного метаболита ST-246, позволяют характеризовать химически синтезированную субстанцию НИОХ-14 как биодоступную при пероральном применении.

**Фармакокинетические параметры активного метаболита
ST-246 в сыворотке крови мышей при однократном
внутривенном применении НИОХ-14 в дозе 2 мкг/г
массы мыши и при однократном пероральном применении
НИОХ-14 в дозах 10 и 50 мкг/г массы мыши**

Параметры (размерность)	Внутривенное введение (2 мкг/г)	Пероральное введение (10 мкг/г)	Пероральное введение (50 мкг/г)
$t_{1/2}$ (ч)	2,320353163	4,703245635	5,649542084
T_{max} (ч)	0,25	3	6
C_{max} (нг/мл)	9515,33±3903,44	5349,00±1428,44	15439,33±3373,47
AUC 0-t (нг/мл)×ч	24918,01	48848,27	141883,35
AUC 0-inf (ч×нг/мл)	25037,95	48912,06	142220,24
AUMC 0-inf (ч ² ×нг/мл)	85626,06	339949,21	1276242,82
MRT 0-inf (ч)	3,42	6,95	8,97

Примечание: C_{max} представлена как $M \pm S_M$ для $n = 6$ (число животных).

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ
ЭКСТРАКТОВ ГРИБОВ ГАСТЕРОМИЦЕТОВ *LYCOPERDON*
PYRIFORME И *PHALLUS IMPUDICUS*
В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А**

**INVESTIGATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY EXTRACTS
OF FUNGI GASTEROMYCETES *LYCOPERDON PYRIFORME*
AND *PHALLUS IMPUDICUS* AGAINST INFLUENZA A**

Е. В. Макаревич¹, М. О. Скарнович¹, И. А. Горбунова²,
Н. А. Мазуркова¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Россия

E. V. Makarevich¹, M. O. Skarnovich¹, I. A. Gorbunova², N. A. Mazurkova¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Russia

² Central Siberian botanical garden Russian Academy of Sciences
Siberian branch research institution, Russia

e-mail: makarevich@vector.nsc.ru

Аннотация

Проведено исследование токсичности и противовирусной активности экстрактов высших грибов гастеромицетов Дождевика грушевидного (*Lycoperdon pyriforme*) и Веселки обыкновенной (*Phallus impudicus*) *in vitro*. Установлено, что все исследованные образцы водных и этанольных экстрактов были малотоксичны для культуры клеток MDCK. Показано, что наибольший противовирусный эффект обнаружен для этанольных экстрактов Дождевика грушевидного (*Lycoperdon pyriforme*) и Веселки обыкновенной (*Phallus impudicus*).

Abstract

Extracts of higher fungi *Gasteromycetes Lycoperdon pyriforme* and *Phallus impudicus* were investigated with respect to their toxicity and antiviral activity *in vitro*. It was founded that all investigated specimens of water and ethanol extracts were low-toxicity for cell culture MDCK. It was shown that the greatest antiviral effect was produced by the ethanolic extracts of *Lycoperdon pyriforme* and *Phallus impudicus*.

В настоящее время по своей социальной значимости грипп находится на первом месте среди всех инфекционных болезней человека. Эволюция вируса гриппа продолжается, и постоянно возникают новые антигенные варианты, вызывающие ежегодные эпидемии этого заболевания. В дополнение к вакцинации, как основной стратегии борьбы с гриппом, ВОЗ рекомендовано применение противовирусных этиотропных химиопрепаратов, подавляющих размножение вируса и направленных на определенную вирус специфическую мишень в его цикле: это препараты адамантанового ряда и ингибиторы нейраминидазы.

В последнее десятилетие в мире наблюдается повышенный интерес к препаратам, в том числе и противовирусным, на основе соединений природного происхождения, что обусловлено низкой токсичностью таких лекарственных средств. Значительный прогресс в области экспериментальной микологии, накопление знаний по химическому составу клеток грибов и их субклеточных фракций на различных стадиях онтогенеза позволили создать новое направление — использование базидиальных грибов в медицинской промышленности. Разнообразные грибные метаболиты, включая антибиотики (АБ), полисахариды (ПС) и ферменты, уже давно применяются в качестве препаратов, открывая эпоху новых лекарственных средств в медицине.

Особый интерес среди базидиальных грибов представляют гастеромицеты в виду наличия богатой сырьевой базы, а также разнообразия в их составе биологически активных веществ, проявляющих противоопухолевые, иммуномодулирующие и противовирусные свойства.

Целью данной работы было изучение *in vitro* противовирусных свойств и механизма действия экстрактов гастероидных грибов, произрастающих в Западной Сибири.

В работе исследовали токсические и противовирусные свойства водных и этанольных экстрактов грибов *Lycoperdon pyriforme* (Дождевика грушевидного) и *Phallus impudicus* (Веселки обыкновенной) на культуре клеток MDCK. Образцы грибов собраны на территории Новосибирской области, коллекции которых хранятся в гербарии лаборатории низших растений ЦСБС СО РАН. В работе были использованы вирус гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и вирус гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2). Штаммы вируса гриппа и культура клеток MDCK получены из коллекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Установлено, что экстракты грибов малотоксичны для культуры клеток MDCK. Оценка противовирусного действия грибных экстрактов в отношении вируса гриппа проводилась разными методами. Сначала оценивалась способность экстрактов защищать клетки от цитопатогенного действия вируса гриппа в сравнении с контрольной инфицированной культурой. Наибольший противовирусный эффект отмечен для этанольных экстрактов Дождевика грушевидного и Веселки обыкновенной, которые защищали более 70 % клеток, при внесении грибных экстрактов в момент инфицирования клеток вирусом гриппа птиц. Затем нами была изучена зависимость ингибирования репродукции вируса гриппа в клетках от концентрации растворов экстрактов. Полное ингибирование репродукции вируса гриппа A/H5N1 наблюдалось в присутствии растворов грибных экстрактов при их максимально переносимых для клеток MDCK концентрациях. При изучении механизма действия экстрактов на репродукцию вируса гриппа в клетках установлено, что экстракты Дождевика грушевидного и Веселки обыкновенной обладает ингибирующим действием на репликацию вируса гриппа A/H3N2 и на адсорбцию вируса гриппа птиц A/H5N1.

Таким образом, установление противовирусной активности экстрактов Дождевика грушевидного и Веселки обыкновенной делает перспективными данные объекты исследования для разработки на их основе препаратов против гриппа.

МУЛЬТИГЕННЫЕ СЕМЕЙСТВА — ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИДОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ*

А. С. Малоголовкин, Г. С. Бурмакина, И. А. Титов

*¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии
Российской академии сельскохозяйственных наук*

A. S. Malogolovkin, G. S. Burmakina, I. A. Titov
VNIIViM, Russia

e-mail: Malogolovkin@inbox.ru

Аннотация

Геном вируса африканской чумы свиней кодирует набор протеинов, ответственных за укрытие от иммунной системы хозяина. Большинство генов принадлежит к мультигенным семействам и являются факторами его патогенности, что также определяет спектр восприимчивых хозяев.

Abstract

The genome of African swine fever virus encodes a number of genes responsible for immune evasion. The vast majority of these genes locates within multigenic families and might be new virulence factors or host-range genes.

Африканская чума свиней (АЧС) инфекционная болезнь, поражающая всех представителей семейства Suidae. Современные и эффективные средства защиты против АЧС не разработаны, а уровень смертности среди инфицированного поголовья домашних свиней и кабанов достигает 100 %.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта №15-34-20995, а также гранта Президента РФ МК-6875.2015.4.

Возбудителем АЧС является ДНК-содержащий вирус (Asfvirus), единственный представитель семейства *Asfarviridae*, принадлежащей к группе крупных ядерно-цитоплазматических ДНК-содержащих вирусов (NCLDV). Размер генома вируса АЧС составляет 180–190 тысяч пар оснований в зависимости от штамма.

В геноме вируса АЧС закодировано большое количество протеинов, модулирующих иммунную систему хозяина. Вирус АЧС используют сложную стратегию «обмана» иммунной системы привлекая механизмы ингибирования апоптоза, ингибирования синтеза интерферона, маскирования рецепторов и дублирования функций клеточных ферментов. Наибольшее количество иммуномодулирующих протеинов закодировано в мультигенных семействах (MGF) вируса АЧС. MGF представляют собой группу генов, кодирующих сходные последовательности протеинов и присутствующих в геноме в нескольких копиях. Количество генов в семействах варьирует между штаммами вируса АЧС.

Используя вирулентные штаммы вируса АЧС, принадлежащие к разным генотипам и сероиммунотипам, и их аттенуированные гомологи, мы достоверно показали различия в их геномах. Адаптированные аттенуированные штаммы вируса АЧС имели значительные делеции (≈ 10 kb) в составе генома на 5'-конце, захватывающие гены в составе MGF 505/360. В некоторых адаптированных к репликации на перевиваемых клеточных линиях штаммах вируса АЧС, также отмечали отсутствие фрагментов (≈ 4 kb) с генами MGF 100 на 3' конце генома. Помимо этого, центральный вариабельный участок генома (CVR) аттенуированных штаммов вируса АЧС содержал дополнительные тандемные повторы в гене (B602L), кодирующем одноименный шапероноподобный белок. Увеличение тандемных повторов не приводило к дефекту в трансляции указанного протеина. Различия в количестве тандемных повторов в гене B602L делает его удобным генетическим маркером для дифференциации вирулентных и близкородственных аттенуированных штаммов вируса АЧС.

Делеция генов MGF505/360, MGF100 в результате аттенуации (селекции) на клеточных линиях свидетельствует об их роли в определении спектра хозяев для вируса АЧС. Полученные данные лягут

в основу для изучения защитных механизмов вируса африканской чумы свиней, как факторов его вирулентности.

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПАНДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ВИРУСА ГРИППА

NEW METHOD OF QUANTITATIVE PANDEMIC POTENTIAL ANALYSIS OF INFLUENZA A VIRUSES

С. В. Мальцев, Н. В. Данильченко,
А. В. Гудымо, О. Г. Пьянкова, А. Б. Рыжиков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

S. V. Maltsev, N. V. Danilchenko,
A. V. Gudyimo, O. G. Pyankova, A. B. Ryzhikov

Аннотация

В настоящей работе главный эпидемиологический параметр R_0 (индекс репродукции) предлагается в качестве количественной меры пандемического потенциала вируса гриппа. Сформулирована теория трансмиссивности R_T как суперпозиции стохастических и кинетических свойств вируса. Показано, что индекс репродукции R_0 пропорционален коэффициенту трансмиссивности R_T , что позволяет считать его главным фактором, определяющим пандемический потенциал вируса. Предложен и экспериментально опробован метод количественного определения коэффициента трансмиссивности вируса гриппа А на примере штаммов A/Anhui/01/2013 (H7N9), A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) и A/India/6427/2014 (H1N1pdm09). Установлена линейная зависимость трансмиссивности R_T от логарифма начальной вирусной дозы, получаемой организмом. Предложенный метод позволяет количественно анализировать пандемический потенциал вируса гриппа А на основе лабораторных данных о характеристиках штамма.

Abstract

In our work we suggest to use the main epidemiological parameter R_0 (basic reproductive number) as a quantitative measure of influenza A pandemic potential. The theory of virus transmissibility rate R_T as superposition of specific kinetic and stochastic virological characteristics was formulated. It was theoretically demonstrated that quantitative measure of pandemic potential R_0 is proportionally associated with transmissibility rate R_T and thereby R_T substantially determines virus strain's pandemic potential. The new method of transmissibility rate R_T quantitative estimation was proposed and experimentally checked for A/Anhui/01/2013 (H7N9), A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) and A/India/6427/2014 (H1N1pdm09) strains. Linear dependence of transmissibility R_T on logarithm of initial inoculated virus dose was established. Proposed theoretical model allows to quantitatively analyze the influenza A pandemic potential on basis of laboratory experimental data on virus strain characteristics.

Введение

Ежегодно вирус гриппа поражает до 15 % населения Земли, что приводит к десяткам тысяч смертельных случаев по всему миру. Пандемии гриппа возникают каждые 10–40 лет. В 2009 году ВОЗ объявила о начале первой пандемии гриппа в 21 веке, которая была вызвана штаммом A/California/7/2009 (H1N1pdm09).

Серьезной угрозой для возникновения новых пандемий являются высоко патогенные штаммы вирусов гриппа птиц (H5N1, H7N9), которые уже преодолели видовой барьер и способны передаваться от птиц к человеку.

На сегодняшний день не существует методов объективной оценки пандемического риска новых вариантов вируса гриппа.

Индекс репродукции R_0 , как количественная мера пандемического потенциала

Индекс репродукции R_0 — среднее количество вторичных случаев заражения, инициированных одним инфицированным индивидуумом. Исходными данными, влияющими на индекс репродукции, могут быть: 1) биологические характеристики вируса, 2) биологические

характеристики организма, 3) характеристики плотности и динамики популяции.

Индекс репродукции R_0 можно выразить следующим образом:

$$R_0 = p \cdot d \cdot c = R_T \cdot c$$

где p — вероятность передачи инфекции при контакте инфицированной особи со здоровой особью, d — длительность инфекции у инфицированной особи, c — количество контактов инфицированной особи со здоровыми в единицу времени. Параметр $R_T = p \cdot d$ характеризует степень передачи инфекции от одной особи к другой, что позволяет считать его мерой трансмиссивности вирусного штамма.

При помещении различных штаммов в схожие популяционные условия индекс репродукции этих вирусов будет полностью характеризоваться их коэффициентами трансмиссивности.

Коэффициенты трансмиссивности R_T и трансмиссии K_T

Вирусная доза на слизистой здорового индивидуума, полученная при контакте с инфицированным индивидуумом (например, через аэрозоль) будет пропорциональна вирусной дозе на слизистой инфицированного (в момент контакта) с коэффициентом пропорциональности K_T :

$$ID = K_T \cdot ID_I$$

$$K_T = k_{ia} \cdot k_{as},$$

где ID — полученная из аэрозоля вирусная доза на слизистой здорового индивидуума, ID_I — вирусная доза на слизистой инфицированного соседа в момент формирования аэрозоля. Коэффициент k_{ia} характеризует степень передачи вирусных частиц со слизистой инфицированного индивидуума в формируемый им аэрозоль, а коэффициент k_{as} — передачу из аэрозоля на слизистую здоровой особи. Коэффициент K_T характеризует степень передачи вируса от одной особи к другой при контакте через аэрозоль или иными способами в более общем случае.

Доза ID_I , от которой посредством коэффициента K_T формируется доза ID , определяется свойствами вирусных частиц. Параметр K_T не

зависит от свойств вируса и определяется внешними факторами. Вирусная доза на слизистой инфицированного организма непостоянна и имеет свою динамику развития во времени $ID_i(t)$.

Вероятность инициации инфекционного процесса определяется полученной организмом вирусной дозой по классической зависимости «доза-эффект». Параметры ID_{50} и σ_{lg} функции $P(ID)$ определяются методом пробит-анализа:

$$\lg(ID) = -\sigma_{lg} \text{probit}(P(ID)) + \lg(ID_{50})$$

Кинетика вероятности $P(t)$ передачи инфекции от инфицированной особи к здоровой:

$$P(ID(t)) = P(K_T ID_i(t)) = P(t)$$

Итоговое выражение для коэффициента трансмиссивности R_T вирусного штамма:

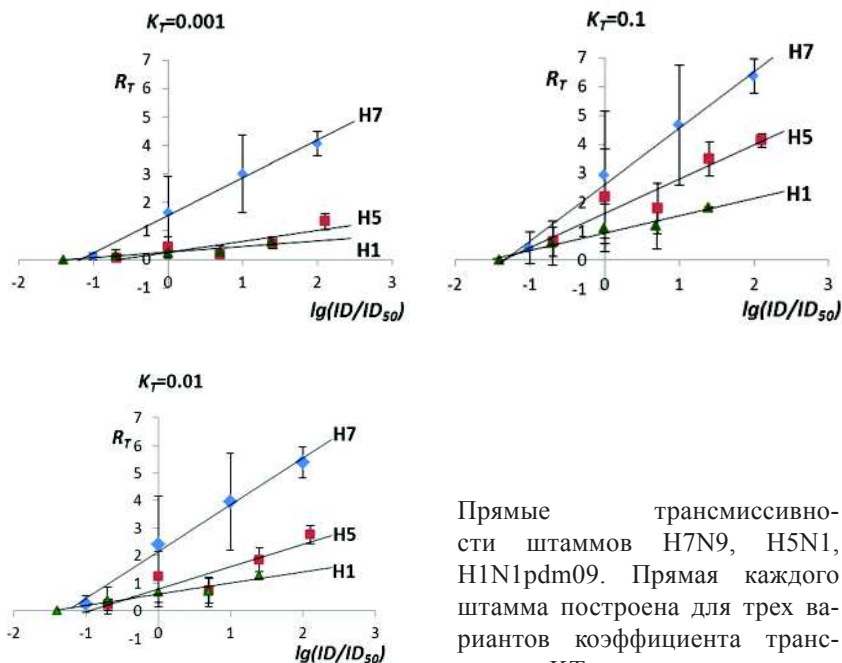
$$R_T = \int_0^{+\infty(d)} P(t) dt$$

Результаты

Для анализа коэффициента трансмиссивности было выбрано три характерных штамма вируса гриппа: A/Anhui/01/2013 (H7N9), A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/India/6427/2014 (H1N1pdm09). В качестве модельных животных использовали морских свинок.

Животных инфицировали интраназально разными вариантами вирусных доз. Были получены три зависимости коэффициента трансмиссивности от логарифма отношения начальной вирусной дозы к ID_{50} для всех трех исследуемых штаммов вируса гриппа и для трех возможных коэффициентов трансмиссии (см. рис.): $K_T = 0.1, 0.01, 0.001$.

Анализ прямых трансмиссивности (см. рис.) для трех штаммов позволяет однозначно расположить их в порядке убывания пандемического потенциала: 1) A/Anhui/01/2013 (H7N9), 2) A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), 3) A/India/6427/2014 (H1N1pdm09).



Данные получены на морских свинках, как наиболее удобной модели анализа как человеческих, так и птичьих вариантов вируса гриппа. Предложенный в данной работе подход для количественного анализа пандемического потенциала вируса гриппа может быть опробован, в том числе, и на хорьках, как более близкой к человеку животной модели.

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ
ПРОТИВООСПЕННЫХ ХИМИЧЕСКИ
СИНТЕЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЫШЕЙ
ИНТРАНАЗАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ ВОО**

**EFFICACY OF THE CHEMICALLY SYNTHESIZED DRUGS IN
INTRANASALLY INFECTED MICE WITH MONKEYPOX VIRUS**

А. С. Овчинникова, Ал. А. Сергеев, Д. О. Галахова, К. А. Титова,
Ар. А. Сергеев, О. С. Таранов, Л. Е. Булычев, А. П. Агафонов,
А. Н. Сергеев

*¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный
научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
п. Кольцово Новосибирской области*

A. S. Ovchinnikova, Al. A. Sergeev, D. O. Galahova, K. A. Titova,
Ar. A. Sergeev, O. S. Taranov, L. E. Bulychev, A. P. Agafonov, A. N. Sergeev
SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Оспа обезьян — зооантропонозная вирусная инфекция, вспышки которой среди людей, преимущественно на территории Африки, значительно выросли по сравнению с 20-м веком. Однако в мире не существует разрешенных к применению лечебно-профилактических химиопрепаратов против ортопоксвирусных заболеваний, в том числе из-за отсутствия дешевых модельных биосистем на основе аутбредных иммунокомпетентных мышей удобных для массового скрининга противооспенной активности препаратов. В тоже время нами были проведены исследования, направленные на разработку модельной биосистемы на основе аутбредных мышей популяции ICR, интраназально (и.н.) инфицированных штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян (ВОО), с целью оценки лечебно-профилактической

эффективности различных противооспенных препаратов. В результате установили, что мыши ICR при и.н. инфицировании обладали высокой чувствительностью к ВОО, при этом величина показателя ID_{50} , оцениваемая по наличию вируса в легких мышей, составила 1,4 lg БОЕ. При изучении динамики распространения ВОО в организме мышей было обнаружено максимальное накопления патогена в слизистой носовой полости, легких и головном мозге. С помощью электронной микроскопии зарегистрированы факты присутствия и размножения патогена в традиционных для ВОО клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах органов респираторного тракта. При оценке эффективности лечебно-профилактического действия препаратов НИОХ-14 и ST-246 на мышах, и.н. инфицированных дозой 3,4 lg БОЕ ВОО, отмечено, значимое подавление размножения вируса в их легких. Таким образом, разработанная нами модельная биосистема «мышь аутбредной популяции ICR — центральноафриканский штамм V79-1-005 ВОО» может быть рекомендована для оценки защитного действия препаратов от оспы обезьян.

Abstract

Monkeypox is a zoo-anthropotic viral infection causing outbreaks mostly among the humans in Africa and amount of cases has significantly increased since the end of 20th century. However, there aren't drugs in the world authorized for chemotherapy against orthopoxvirus diseases as one of the reasons are due to the lack of cheap model biosystems based on outbred immunocompetent mice suiting for mass screening of anti smallpox drug activity. At the same time we have conducted research aimed at developing a model biosystem using outbred ICR mice intranasally (i.n.) infected with V79-1-005 strain of monkeypox virus (MPXV) to evaluate therapeutic and prophylactic efficacy of the various smallpox drugs. As a result, we found that i.n. infected ICR mice were highly sensitive to MPXV with ID_{50} (1.4 lg PFU) estimated by detection of a live virus in the lungs of mice. Maximum pathogen accumulation was observed in a mucous membrane of nasal cavity, lungs and brain of mice, when the dynamics of MPXV propagation were studied. The presence and reproduction of the pathogen in the traditional for MPXV cells like as mononuclear phagocytes and epithelial cells

of the respiratory tract were revealed using electron microscopy. In assessing the effectiveness of drugs NIOC-14 and ST-246 for treatment and prophylactic of i.n. infected with MPXV (the dose 3.4 lg PFU) mice were noted a significant suppression of viral replication in lungs. Thus, the model biosystem (outbred ICR mice and Central African strain V79-1-005 of MPXV) were developed and in future it might be used to evaluate different drugs on protection to monkey-pox.

Масштабность и частота возникновения вспышек оспы обезьян среди людей в 21-м веке значительно выросла по сравнению с 20-м веком, что, вероятно, связано со снижением у них напряженности иммунитета и величины иммунной прослойки к возбудителю этого заболевания из-за прекратившейся более 30 лет тому назад вакцинации людей от натуральной оспы. По настоящее время в мире не существует разрешенных к применению лечебно-профилактических химиопрепаратов против оспы обезьян и других ортопоксвирусных заболеваний. В этой связи в разных странах ведутся исследования, направленные на разработку таких препаратов. Многие специалисты используют различные виды животных в качестве модельных для оспы обезьян с целью оценки эффективности создаваемых противооспенных лекарств: иммунодефицитных мышей [Hutson et al., 2010a; Americo et al., 2010; Stabenow et al., 2010], сусликов [Tesh et al., 2004; Sbrana et al. 2007a; Sbrana et al., 2007b], чернохвостых луговых собачек [Xiao et al., 2005; Hutson et al., 2009, 2010b], сонь Келлена [Schultz et al., 2009] и приматов [Zaucha et al., 2001; Parker et al., 2008; Stabenow et al., 2010]. Однако эти виды модельных животных имеют те или иные существенные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения.

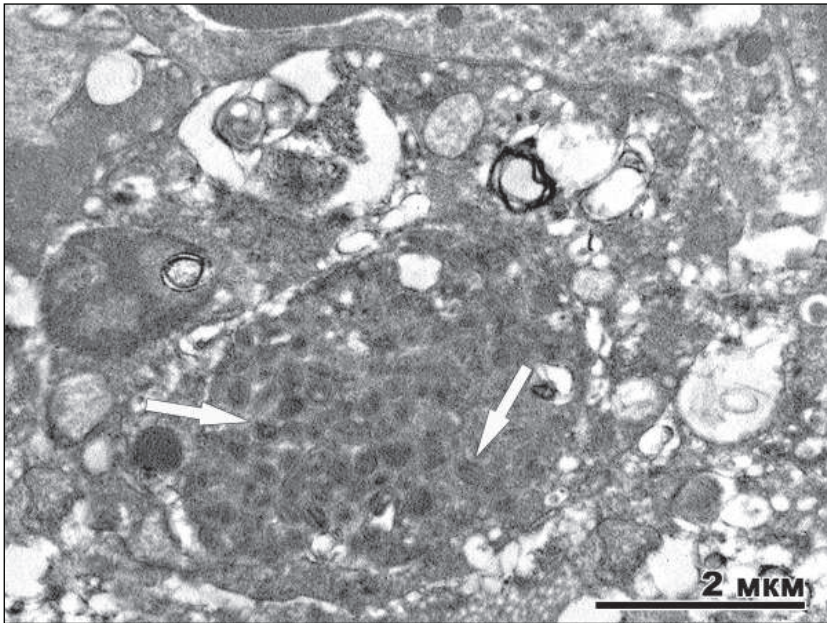
Одним из препятствий быстрому прогрессу в разработке медицинских средств защиты от оспы обезьян является отсутствие дешевых модельных биосистем на основе аутбредных иммунокомпетентных мышей для массового скрининга противооспенной активности препаратов, что делает актуальной проблему разработки такой лабораторной модели.

Целью настоящих исследований явилась разработка модельной биосистемы на основе аутбредной мыши ICR инфицированной вирусом оспы обезьян (ВОО) с целью оценки лечебно-профилактической эффективности противооспепных химиопрепаратов.

В работе были использованы штамм V79-1-005 ВОО и аутбредные мыши популяции ICR, а также комплекс вирусологических, гистологических, электронно-микроскопических и статистических методов исследований.

В результате проведенных экспериментальных исследований по оценке чувствительности к ВОО у интраназально (и.н.) зараженных мышей была определена величина ID_{50} , оцениваемая по наличию вируса в легких через 7 сут после заражения (п.з.) с учетом 10 %-й его аппликации в респираторном тракте животных, которая составила 1,4 lg БОЕ. При изучении динамики распространения ВОО в организме и.н. зараженных мышей 25 ID_{50} (определенная по наличию вируса в их легких) было обнаружено максимальное накопление патогена в стенке слизистой носовой полости, легких и головном мозге: $5,7 \pm 0,1$; $5,5 \pm 0,1$ и $5,3 \pm 0,3$ lg БОЕ/мл соответственно. Основные гистологические изменения в органах и тканях у и.н. инфицированных ВОО мышей напоминали таковые у других модельных животных для оспы обезьян, но ограничивались в основном воспалительно-деструктивными изменениями в органах респираторного тракта. При проведении электронной микроскопии органов и тканей и.н. инфицированных мышей зарегистрированы факты присутствия и размножения патогена в традиционных для ВОО первичных клетках мишенях (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других клетках организма (эндотелиоцитах, ретикулярных клетках, клетках соединительной ткани).

При изучении эффективности лечебно-профилактического действия препаратов на мышях, и.н. инфицированных дозой 3,4 lg БОЕ (10 ID_{50} рассчитанной по регистрации наличия вируса в легких) ВОО, отмечено, что количество обработанных препаратами НИОХ-14(7-[N`-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота) и ST-246 (4-трифторметил-N-



Электроннограмма, альвеолярный макрофаг мыши аутбредной популяции ICR через 7 сут после интраназального заражения штаммом V79-1-005 вируса оспы обезьян дозой 3,8 Ig БОЕ (25 ИД₅₀): зрелые частицы вируса в цитоплазме (указаны стрелками)

(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) аутбредных мышей с выявленным наличием живого ВОО в легких через 7 сут п.з. достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0,05$). Было установлено, что НИОХ-32 (Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.02,6.08,10]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксибензамида) значительно не повлиял на размножение ВОО в легких у мышей через 7 суток и показатель количества животных с выявленным наличием вируса в легких не отличался от контроля. При этом при использовании НИОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах существенных различий в эффективности подавления размножения ВОО не выявлено между этими препаратами.

Таким образом, с применением аутбредных мышей популяции ICR и центральноафриканского штамма V79-1-005 ВОО на примере трех хи-

мически синтезированных соединений (ST-246, НИОХ-14 и НИОХ-32) подтверждена возможность оценки противовирусного эффекта у препаратов, для которых ранее уже была отмечена многими исследователями на других модельных биосистемах противоопухолевая активность. Данное обстоятельство подтверждает, что разработанная нами модельная биосистема «мышь аутбредной популяции ICR — центральноафриканский штамм V79-1-005 ВОО», может быть рекомендована для оценки защитного действия препаратов от оспы обезьян, в том числе при проведении их массового скрининга.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ ВИРУСА
ГРИППА СВИНЕЙ А/Н1N1, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2010 И 2012 ГГ.
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF SWINE INFLUENZA
A/H1N1 VIRUSES, ISOLATED IN THE KAZAKHSTAN REPUBLIC
IN 2010 AND 2012**

Н. С. Онгарбаева, Г. В. Лукманова,
Н. Т. Сактаганов, Т. И. Глебова, Н. Г. Кливлеева

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

N. S. Ongarbayeva, G. V. Lukmanova, N. T. Saktaganov,
T. I. Glebova, N. G. Klivleyeva

*Institute of Microbiology and Virology — CS MES, Republic of
Kazakhstan*

e-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

Приведены результаты изучения биологических свойств штаммов вируса гриппа А (H1N1), выделенных от свиней в животноводческих

хозяйствах Казахстана в 2010 и 2012 гг. Показано, что внутри подтипа они представляют собой в основном однородную группу.

Abstract

There are the results of the study of the biological properties of swine influenza A/H1N1 viruses, isolated from pigs at farms of Kazakhstan in 2010 and 2012. They are show the viruses are represent a mainly homogeneous group within the subtype.

Появление у человека вируса гриппа А (H1N1)pdm, являющегося комплексным реассортантом генотипов свиного происхождения, подчеркнуло важность наблюдения вируса гриппа у свиней во всем мире, в том числе и в Казахстане.

В эпидемический период 2010–2012 гг. при исследовании 135 носоглоточных смывов, собранных от свиней в небольших и крупных хозяйствах северного и южного регионов Республики (Алматинская и Костанайская области), выделено восемь гемагглютинирующих агентов, идентифицированных в РТГА, РИНА и РТ-ПЦР как вирусы гриппа А с антигенной формулой H1N1. Инфекционная активность казахстанских изолятов варьировала в пределах 4,65–5,25 lg ЭИД_{50/0,2}. По термочувствительности гемагглютинина изоляты вируса гриппа свиней, представляют собой однородную группу и отнесены к термостабильным, поскольку сохраняли способность вызывать агглютинацию эритроцитов курицы после прогревания при 56 °С в течение 60 мин. Результаты изучения чувствительности выделенных штаммов к сывороточным ингибиторам в РТГА с нативными и прогретыми (62 °С — 30 мин, 100 °С — 10 мин) сыворотками морской свинки, курицы и кролика показали, что все изоляты являлись ингибиторорезистентными по отношению к нативным сывороткам, но прогревание их способствовало повышению ингибиторной активности. Установлено, что по спектру гемагглютинирующей активности с эритроцитами человека «0» группы крови и различных видов млекопитающих и птиц, казахстанские изоляты активно агглютинировали все виды эритроцитов. При изучении адсорбирующей и элюирующей способности выявлено, что все изученные вирусы обладали хо-

рошей адсорбирующей способностью по отношению к эритроцитам кур (90–100 %) и элюировали с них через 30–60 мин инкубации при 37 °С. Таким образом, по основным биологическим свойствам казахстанские изоляты вируса гриппа свиней представляют собой однородную группу, но отличаются по инфекционной активности.

ГЕНОТИПЫ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ И САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

GENOTYPES OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN LENINGRAD DISTRICT AND ST-PETERSBURG

Ю. А. Панферова ¹, К. А. Третьяков ², М. А. Суворова ³

¹ *ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера*

² *Зоологический институт РАН*

³ *НИИ экспериментальной медицины СЗО РАН*

Y. A. Panferova, K. A. Tretyakov, M. A. Suvorova

¹ Pasteur Institute in St-Petersburg, Russia

² Zoology Institute RAS, Russia

³ Research Institute of Experimental Medicine RAS, Russia

Аннотация

Клещевые инфекции являются актуальной проблемой для Ленинградской области и Санкт-Петербурга. В данной работе представлены результаты исследования клещей, снятых с людей, на носительство вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Определен генотип выявленных патогенов.

Abstract

Tick-borne encephalitis (TBE) is an actual problem for public health in Leningrad district and St-Petersburg city. This paper presents

results of TBE virus detection in ticks, removed from human, and genotyping of detected pathogens.

Инфекции, передаваемые иксодовыми клещами, имеют широкое распространение в умеренных широтах Северного полушария; одной из наиболее актуальных инфекций данной группы является вирусный клещевой энцефалит (ВКЭ), вызываемый РНК-геномным флавивирусом. Основные переносчики вируса — иксодовые клещи, максимальная вирусофорность на территории РФ, как правило, обнаруживается у *Ixodes persulcatus*, несколько меньшая — у *I. ricinus*. Выделяют 3 подтипа вируса клещевого энцефалита, различающихся по генетической структуре и антигенным свойствам, — западный, сибирский и дальневосточный, при этом отмечается взаимосвязь клинических признаков заболевания и тяжести течения с подтипом возбудителя. На территории России циркулируют все три подтипа вируса. Установлено, что в странах Балтийского региона и на территории СЗФО возможна циркуляция западного и сибирского подтипов. Мониторинг генетической структуры природных популяций вируса КЭ важен для прогнозирования развития эпидемиологической ситуации и установления особенностей течения заболевания в отдельных регионах. Целью настоящего исследования являлась оценка распространения генотипов вируса КЭ на территории Ленинградской области и Санкт-Петербурга.

На носительство вируса КЭ было исследовано 499 клещей, снятых с людей. Во всех случаях клещи относились к роду *Ixodes* sp. Клещи индивидуально гомогенизировались в стерильном физиологическом растворе, выделение РНК проводилось с использованием набора «Амплипрайм Рибо-преп». После проведения реакции обратной транскрипции детекция вирусной кДНК осуществлялась по методике А. Вогмана с помощью двухраундовой ПЦР с праймерами Pm1, Pp1 и Pm2, Pp2, фланкирующими участок 5'-нетранслируемой области. Продукты реакции электрофоретически разделяли в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, и визуализировали с помощью трансиллюминатора. Генотипи-

рование положительных образцов проводилось методом прямого секвенирования ампликонов (полученных в ходе ПЦР с праймерами Pm2 и Pp2). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивались с последовательностями, задепонированными в международной базе GenBank.

Вирусофорность клещей, снятых с людей, составила 1 % (5 положительных образцов). По результатам анализа нуклеотидных последовательностей амплифицированного локуса 5'-нетранслируемой области все образцы принадлежали к западному подтипу вируса КЭ.

Санкт-Петербург и Ленинградская область относятся к территориям, эндемичным по ВКЭ. Значительную роль в повышении риска заболеваемости играет повышение среднегодовых температур, благоприятствующее росту численности иксодовых клещей — основных переносчиков вируса КЭ, а также антропогенная трансформация природных ландшафтов, в ходе которой увеличивается риск контакта людей с клещами. Вирусофорность клещей и распространенность генотипов вируса КЭ на определенных территориях являются важными показателями напряженности очагов данного природно-очагового заболевания. В ходе исследования генетические маркеры вируса КЭ были обнаружены у 1 % клещей рода *Ixodes* sp., снятых с людей на территории Ленинградской области и Санкт-Петербурга. Установлена циркуляция западного подтипа вируса, что характерно для Восточной Европы и стран Балтийского региона. Сибирский подтип вируса КЭ, который также обнаруживается в природных очагах Европейской части РФ, не был обнаружен.

ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ ГРИППА 2013–2016 ГГ. В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ СРЕДИ ДЕТЕЙ

INFLUENZA EPIDEMIC SEASON 2013–2016 IN SAINT-PETERSBURG IN CHILDREN

П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко, С. М. Щеканова,
А. Д. Васильева, А. И. Желтухина, Т. Г. Лобова, М. Ю. Еропкин

ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ

e-mail: Suddenkovapolina@gmail.com

Аннотация

Вирусы гриппа и другие ОРВИ остаются до настоящего времени наиболее распространенными и практически неуправляемыми инфекциями. Наибольшую опасность они представляют для детей до трех лет, которые составляют одну из основных групп риска. Анализ антигенной изменчивости вирусов гриппа лежит в основе изучения эволюции данного возбудителя и отбора вакцинных компонентов на предстоящий эпидемический сезон.

Abstract

Influenza viruses nowadays are still of great economic and social threat. Children under 3 years comprise one of the major influenza risk groups. Analysis of influenza virus evolution is based on antigenic variation studies, which are also used for selection of candidate vaccine viruses for the production of influenza vaccine for the upcoming epidemic season.

Грипп и другие острые респираторные вирусные инфекции занимают первое место в этиологической структуре общей заболеваемости населения. Несмотря на успехи вакцино- и химиопрофилактики, грипп остается наиболее распространенной и неконтролируемой инфекцией. У лиц, относящихся к группам риска, грипп часто сопровождается большим количеством осложнений — пневмонией, поражением нервной системы, почек, сердечно-сосуди-

стой системы и т. д. Дети до 18 лет ежегодно активно вовлекаются в эпидемический процесс, связанный с вирусами гриппа и другими ОРВИ.

Для анализа уровня изменчивости современных вирусов гриппа производили выделение штаммов из назофарингиальных мазков, полученных от госпитализированных детей от 0 до 18 лет, на клеточной культуре MDCK (CDC, Atlanta, USA), 10 дневных развивающихся куриных эмбрионах, поставляемых ООО «Племрепродуктор» (пос. Синявино, Ленинградская область, Россия). Далее проводили идентификацию вирусов и их антигенный анализ, в реакции торможения гемагглютинации с панелью диагностических антисывороток, предоставляемых ВОЗ для идентификации вирусов гриппа человека и панелью крысиных антисывороток, полученных к широкому спектру современных вирусов гриппа человека А и В.

Вирусы гриппа А(Н3N2)

В исследуемые эпидемические сезоны 2013–2016 гг. наблюдалась одновременная циркуляция вирусов гриппа А(Н3N2), А(Н1N1) pdm09 и вирусов гриппа В. В 2013–2014 гг. вирусы гриппа А(Н3N2) доминировали и составляли 80,5 % от всех выделенных штаммов. В 2014–2015 гг. они составили 30 %, а в 2015–2016 гг. вирусов данного подтипа из материалов от детей выделено не было.

При анализе антигенных взаимодействий изолятов 2013–2014 гг. с антисывороткой, полученной к вирусу-кандидату в вакцинные штаммы А/Техас/50/12 было показано, что большинство выделенных вирусов подобны данному штамму и, следовательно, данный компонент вакцины являлся актуальным на тот сезон. В эпидемический сезон 2014–2015 гг. был зафиксирован антигенный дрейф вирусов А(Н3N2), выявлена гетерогенность популяции: зарегистрированы вирусы подобные А/Санкт-Петербург/80/14 и вирусы подобные А/Швейцария/9715293/13. В то же время, в составе вакцины по-прежнему находился штамм, подобный А/Техас/50/12. Вследствие этого очевидно, что вакцинный компонент по вирусам данного подтипа установленный на эпидемический сезон 2014–2015 гг. не соответствовал этиологической структуре возбудителя.

Вирусы гриппа *A(H1N1)pdm09*

Циркуляция вирусов гриппа данного подтипа была отмечена во всех трех эпидемических сезонах 2013–2016 гг. Удельный вес данного возбудителя в разные сезоны колебался и составил 11,7 %, 7 % и 80,5 % соответственно. Детальный анализ антигенных взаимодействий исследуемых штаммов показал, что вирусы гриппа подтипа *A(H1N1)pdm09* данных эпидемических сезонов были антигенно схожи с эталонным и вакцинным штаммом А/Калифорния/7/09. Таким образом, исходя из данных антигенного анализа, можно утверждать, что компонент противогриппозной вакцины А/Калифорния/07/09 во всех трех сезонах был актуальным.

Вирусы гриппа типа В

В 2013–2014 гг. и 2014–2015 гг. была отмечена активная циркуляция вирусов гриппа В Ямагатской разновидности. Удельный вес данного типа составил 7,8 % и 63 % соответственно. В последний эпидемический сезон был выделен только 1 штамм данной линии. Антигенный анализ вирусов гриппа В Ямагатской линии 2013–2015 гг. показал их гомогенность, все они были подобны эталонному вирусу В/Пхукет/3073/13. Вирус, выделенный в эпидемическом сезоне 2015–2016 гг., был антигенно схож с вирусами Ямагатской линии 2012–2013 гг.

В 2015–2016 гг. была отмечена активная циркуляция вирусов гриппа В Викторианской разновидности. Они составили 18,3 % от всех изолятов. Вирусы гриппа В Викторианской линии реагировали с антисывороткой к эталонному штамму В/Брисбен/60/08 до 1–1/2 гомологичного титра, что показывает их антигенную однородность. Стоит особо отметить, что в прошедшем эпидемическом сезоне в составе тривалентных противогриппозных вакцин, применяемых в России и в мире, в качестве компонента гриппа В был включен вирус Ямагатской линии, подобный В/Пхукет/3073/13, при этом в циркуляции ведущая роль принадлежала вирусам Викторианской линии, что позволяет говорить о выраженном несоответствии циркулирующих штаммов гриппа В и состава противогриппозной вакцины.

Подводя итог, хочется подчеркнуть, что антигенный анализ позволяет подробно и четко охарактеризовать свойства и эволюционную изменчивость вирусов гриппа. Эти данные помогают наглядно оценить антигенное соответствие циркулирующих в популяции штаммов с вирусами-кандидатами, включенными в состав противогриппозных вакцин на эпидемический сезон. Так, вирусы гриппа подтипа А(Н3N2) и типа В последних двух эпидемических сезонов показали несоответствие выбранного вакцинного компонента и циркулирующих штаммов. В связи с этим было отмечено большее распространение вирусов данного подтипа среди населения, в том числе среди детских возрастных групп. Эти данные свидетельствуют о необходимости проведения более детального и масштабного антигенного анализа вирусов гриппа человека для того, чтобы повысить качество отбора штаммов-кандидатов для противогриппозных вакцин. В то же время, проблема несоответствия компонентов вакцины по гриппу В может быть решена внедрением в практику тетравалентных вакцин, которые с успехом применяются уже несколько лет в ряде зарубежных стран.

СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЛИХОРАДКОЙ ЗИКА

SEROLOGICAL STUDY OF BLOOD SAMPLES FROM PATIENTS WITH ZIKA FEVER

А. А. Ружкова ¹, С. А. Пьянков ¹, Н. Л. Максимов ¹,
О. В. Пьянков ¹, Л. А. Карань ², А. П. Агафонов ¹

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

² *ФБУН Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии*

A.A. Rujkova ¹, S.A. Pyankov ¹, N.L. Maximov ¹, O.V. Pyankov ¹,
A.P. Agafonov ¹, L.A. Karan ²

¹ SRC VB "Vector", Russia

² CRI of Epidemiology, Russia

Аннотация

В работе представлены результаты анализа сывороток больных лихорадкой Зика с помощью экспериментального набора «Вектор ИФА Зика-АТ скрин». Обсуждается возможность использования иммуноферментного анализа для диагностики лихорадки Зика.

Abstract

In this investigation Serological Analysis of samples of patients with Zika fever are presented using an experimental ELISA kit "Vector ELISA-Zika AT screen". The possibility of using ELISA for the diagnosis of Zika fever are discussed.

Впервые вирус Зика был описан в 1948 году как агент, вызывающий болезнь у макак-резусов, живущих в лесу Зика в Уганде, затем в Уганде, Танзании, Египте, Центральноафриканской Республи-

ке и Сьерра-Леоне стали регистрироваться периодические случаи заражения этим вирусом людей, и в 1968 году в Нигерии вирус был впервые выделен от больного человека. Однако особое внимание лихорадка Зика привлекла к себе в 2007 году после событий на островах Яп в Тихом океане (Федеративные штаты Микронезии). Врачи, работавшие на этом острове, сообщили в CDC, USA о том, что среди местного населения распространяет не встречавшееся ранее в Микронезии заболевание. Все заболевшие благополучно выздоровели, но общее число заразивших составило не менее 5 тысяч человек, что составляет 70 % населения островов. Было доказано, что заболевание было вызвано вирусом Зика, который ранее за пределами Африканского континента не встречался. В начале 2013 года еще более масштабная вспышка лихорадки Зика охватила Французскую Полинезию. К концу года сообщалось уже о более чем 20 тысячах случаев заболевания.

В начале 2015 года на севере Бразилии в штате Баия началась панамериканская вспышка лихорадки Зика. К августу 2016 года общее число стран, вовлеченных в эпидемическое распространение лихорадки Зика, составляет уже 54.

После подтверждения 140 случаев микроцефалии у новорожденных в 44 штатах страны, министерство здравоохранения Бразилии объявило чрезвычайное положение. К концу 2015 года связь между заболеванием лихорадкой Зика у беременных и микроцефалией у новорожденных считается доказанной, и 1 февраля 2016 года ВОЗ объявила чрезвычайную ситуацию в здравоохранении в связи с микроцефалией и неврологическими состояниями, имеющими прямое отношение к вирусу Зика. Кроме этого вирус Зика вызывает еще одно заболевание – синдром Гийена-Барре (СГБ), которое может быть вызвано и другими флавивирусами, например вирусами денге и чикунгунья. Синдром Гийена-Барре – это нарушение, при котором иммунная система атакует часть собственной периферической нервной системы организма. Синдром может влиять на периферические нервы, контролирующие мышечную силу, а также те, которые передают ощущения боли, температуры и осязания. Это может привести к мышечной слабости и потере чувствительности в ногах и/или

руках. Примерно 25 % пациентов с СГБ нуждаются в интенсивной терапии и 3–5 % умирают даже при надлежащей поддерживающей терапии, из-за осложнений, связанных параличом мышц, контролирующего дыхание, остановкой сердца или тромбами.

Общее число пострадавших лиц в странах Американского региона составляет около 600 тыс. человек за 2016 год, в том числе более 111 тыс. – с лабораторно подтвержденным диагнозом. Наиболее сложной, в эпидемиологическом плане, обстановка сохраняется в Бразилии, где за время эпидемии зарегистрировано 1835 случаев микроцефалии и неврологических нарушений у новорожденных, а общее число случаев заболевания с подозрением на лихорадку Зика составляет более 1,5 млн.

Основными переносчиками вируса Зика являются комары рода *Aedes*. Серологические исследования населения, проведенные в 1988 и 1990 гг. показали наличие у 10,1 % и 2,8 % населения антител IgM к вирусу Зика, соответственно. До 40 % городской популяции в Нигерии имеют вируснейтрализующие антитела к вирусу Зика.

Диагностика заболевания может осуществляться методом ПЦР. Вирус Зика был обнаружен в цельной крови (также в сыворотке и плазме), моче, спинномозговой жидкости, амниотической жидкости, сперме и слюне. Метод ПЦР необходимо использовать для пациентов, у которых симптомы наблюдаются менее 7 дней. В моче и сперме вирус присутствует более длительное время. Серологическое исследование (выявление антител IgM) необходимо проводить у пациентов, у которых симптомы наблюдаются более 6 дней.

Задачей нашего исследования было установление максимальных сроков серодиагностики лихорадки Зика. Сложность выявления специфических антител к вирусу Зика в его родовой принадлежности: Основной репертуар антител на вирус Зика нарабатывается на родоспецифические антигены. Использовался разработанный нами набор реагентов для иммуноферментного выявления суммарных антител (в том числе специфических IgM, IgG) к вирусу Зика. Его первая особенность – в выявлении антител исключительно к специфическим последовательностям белков вируса Зика: короткие рекомбинантные конструкции, аналогичные пептидам белков Envelope, Core и NS4A,

являются основой иммуносорбента и биотинового конъюгата. Его вторая особенность в используемой разновидности анализа, «сэндвич»: происходит детекция всех специфических антител независимо от их класса или видовой принадлежности анализируемой крови; это предполагает расширение сроков серодиагностики.

Исследуемым материалом были образцы сыворотки и плазмы крови восьми пациентов с клиническим диагнозом «лихорадка Зика». Диагноз был лабораторно подтвержден ПЦР-методом. Забор образцов крови больных и переболевших осуществлялся неоднократно с разными промежутками времени. Исследования проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан».

Все образцы были исследованы в одном эксперименте согласно проекта инструкции по применению набора с использованием аттестованной отделом биологического и технологического контроля серии. Для проведения анализа образцы крови развели в 5 раз. Полученные результаты приведены в таблице.

**Наличие специфических антител у больных лихорадкой Зика,
определенное с применением набора «Вектор ИФА Зика-АТ
скрин» в единицах оптической плотности
при длине волны 450 (OD₄₅₀)**

№ пациента	Срок от начала заболевания (сут)	ОП образца (OD ₄₅₀)
1	7	1,183
	12	2,016
	13	2,422
	14	2,506
	57	0,188
2	7	1,750
	9	1,658
	15	0,756
	141	0,156

Окончание табл.

3	2	0,065
	4	0,103
	5	0,219
	6	0,385
	8	0,945
	9	2,052
	14	2,096
	43	3,186
4	4	0,149
	5	0,275
	8	1,057
5	4	0,194
	5	0,224
	7	1,169
	10	3,408
6	4	0,263
	5	0,311
	6	1,420
	7	1,546

Значение ОП К+=3,434

Значение ОП К-=0,051

ОП крит=0,251, положительные образцы выделены штифтом

Из приведенных в таблице данных видно, что антитела к вирусу Зика в сыворотке крови больных методом иммуноферментного анализа могут выявляться, начиная с 4 суток от появления клинических признаков заболевания, и сохраняться на протяжении как минимум 1,5 месяцев.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА А
В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ
СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА В 2014–2016 ГГ.**

**DETECTION OF ANTI-INFLUENZA A VIRUS ANTIBODY
IN THE SERUMS OF PIGS IN THE NORTHERN KAZAKHSTAN
IN 2014–2016**

Н. Т. Сактаганов, М. К. Қалқожаева, М. Г. Шаменова,
Н. С. Онгарбаева, Л. К. Амирасшева, Н. Г. Кливлеева

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

N. T. Saktaganov, M. K. Kalkozhayeva, M. G. Shamenova,
N. S. Ongarbayeva, L. K. Amirasheva, N. G. Klivleyeva.
Institute of Microbiology and Virology — CS MES,
Republic of Kazakhstan

biochem_vir@mail.ru

Аннотация

Представлены результаты серологического анализа 108 сывороток крови, собранных от свиней в 2014–2016 гг. в животноводческих хозяйствах северного Казахстана, в РТГА. Полученные данные указывают на социркуляцию в указанный период среди животных вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2.

Abstract

There are the results of HI analysis of 108 serum samples collected from pigs at farms of northern Kazakhstan in 2014–2016. The data indicate the cocirculation of influenza viruses A/H1N1 and A/H3N2 among the animals during this period.

Популяции свиней играют важную роль в эволюции вируса гриппа, так как они являются уникальным резервуаром для реассортации возбудителей инфекции от разных хозяев [Tran G. M. K., et al. 2010]. В настоящее время среди свиней чаще всего циркулируют штаммы вируса гриппа подтипа A/H1N1, в меньшей степени встречаются вирусы A/H3N2, A/H1N2 и типа C [Baratelli M., et al. 2013]. Изучение особенностей циркуляции вариантов вируса гриппа в свиной популяции имеет большое значение для своевременного прогнозирования и профилактики заболевания гриппом как животных, так и людей.

Целью настоящей работы явился серологический анализ циркуляции вируса гриппа А в популяции свиней на территории северного региона Республики Казахстан в 2014–2016 гг. Материалом для исследования служили 108 образцов сывороток крови, собранные от свиней в животноводческих хозяйствах Северо-Казахстанской и Костанайской областях. Уровень специфических антител к гемагглютиниnam вируса гриппа в сыворотках крови определяли в РТГА с использованием набора эталонных штаммов: A/New Jersey/8/76 (H1N1), A/Swine Iowa (Hsw1N1), а также A/Wisconsin/67/05 (H3N2). Установлено, что серопозитивными по отношению к вирусу гриппа оказались 39 сывороток крови (36,1 % от общего числа исследованных образцов). Антитела в наибольшем количестве 25 сывороток крови (23,1 %) и в высоких титрах (1:80–1:320) выявлялись к вирусу гриппа A/H1N1. 13 сывороток крови (12,0 %) оказались положительными по отношению к вирусу гриппа A/H3N2, антитела отмечены в титрах 1:80–1:160. Лишь в одной пробе (0,9 %) обнаружены антигемагглютинины одновременно к обоим подтипам вируса гриппа A(H1+H3).

Таким образом, в результате серологических исследований установлено, что на территории Северного Казахстана в популяциях свиней наблюдалась социркуляция субтипов A/H1N1 и A/H3N2 вируса гриппа. Полученные данные позволят определить тактику и планирование противоэпизоотических мероприятий, направленных на профилактику и искоренение инфекционных болезней свиней.

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВИРУСОВ ГРИППА А И В, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ СРЕДИ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РФ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2015–2016

CHARACTERIZATION OF INFLUENZA A AND B VIRUSES, ISOLATED FROM HUMANS DURING 2015–2016 SEASON IN RUSSIA

С. В. Святченко, А. Г. Дурыманов, И. М. Суслопаров,
Н. П. Колосова, Н. И. Гончарова, В. Ю. Марченко, А. В. Шиповалов,
А. В. Епанчинцева, О. В. Петрова, А. Б. Рыжиков, Т. Н. Ильичева

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

Аннотация

В эпидемическом сезоне 2015–2016 в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» было выделено и охарактеризовано 404 изолята вирусов гриппа А и В.

Abstract

During 2015–2016 influenza season 404 influenza viruses A and B have been isolated and characterized in SRC VB “Vector”, Russia.

Введение. Система мониторинга за сезонным гриппом является важным средством обеспечения эпидемиологического благополучия населения, позволяющим отслеживать изменение спектра и характеристик циркулирующих штаммов. На территории Российской Федерации (РФ) мониторинг осуществляют Национальные центры ВОЗ по гриппу при взаимодействии с региональными Центрами Гигиены и Эпидемиологии (ЦГиЭ). Кроме того, образцы клинического материала, собранные от пациентов из групп риска (беременные; дети; пациенты с хроническими заболеваниями; лица, контактировавшие с животными, способными переносить вирус гриппа), а также от пациентов с тяжелым течением заболевания (в том числе завершившимся

летальным исходом), в которых было подтверждено наличие генетического материала вирусов гриппа, направляются во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» для углубленного вирусологического исследования.

Цель работы

Изоляция сезонных штаммов вирусов гриппа А и В, циркулировавших на территории РФ в эпидемическом сезоне 2015–2016, с последующей генетической и антигенной характеристикой изолятов и определением их чувствительности к лекарственным препаратам.

Материалы и методы. В период с декабря 2015 г. по июнь 2016г. в Центр поступили образцы клинического материала от 1089 нефатальных случаев заболевания гриппом (мазки и смывы со слизистой верхних дыхательных путей) и 500 случаев, завершившихся летальным исходом, (секционный материал; прижизненно-взятые мазки) из 65 субъектов РФ, а также ряда иностранных государств и территорий (Республики Армения, Абхазии, Луганска и Донеска). Во всех случаях диагноз «грипп» был предварительно лабораторно подтвержден в региональных ЦГиЭ методом ОТ-ПЦР. Из поступивших проб нами проводилось выделение изолятов в культуре клеток MDCK с последующим их типированием в ОТ-ПЦР с использованием наборов реагентов «АмплиСенс Influenza virus А-тип-FL; А/В-FL; А/Н1-swine-FL». Выделенные изоляты были антигенно охарактеризованы в РТГА с референс-сывороткой с использованием эритроцитов гуся. Для получения поликлональной сыворотки интраназально заражали хорька, предварительно исследованного в РТГА на отсутствие противогриппозных антител, вирусом гриппа А, через 3 недели проводили забор крови. Анализ чувствительности изолятов к действию антинейраминидазных препаратов проводили в флуоресцентном тесте ингибирования нейраминидазы, позволяющем определить для анализируемых лекарственных средств концентрацию полумаксимального ингибирования активности фермента (IC₅₀). Все исследования проводились в соответствии с методическими указаниями ВОЗ по лабораторной диагностике гриппа.

Результаты

Из образцов клинического материала, полученного от 1089 нефатальных случаев заболевания гриппом, в культуре клеток MDCK было выделено 289 изолятов, 275 из которых были типированы в ОТ-ПЦР как вирус гриппа A(H1N1pdm09), 6 как A(H3N2), 4 как вирус гриппа В, генетическая линия Виктория и 4 как вирус гриппа В, генетическая линия Ямагата. Из образцов секционного материала и прижизненно-взятых мазков, полученных от 500 человек, умерших от гриппа, было выделено 115 изолятов, 114 из которых были отнесены к подтипу A(H1N1pdm09), и 1 к подтипу A(H3N2).

Для 20 штаммов вируса гриппа A(H1N1pdm09) и одного штамма вируса гриппа A(H3N2) были определены нуклеотидные последовательности генов гемагглютинаина и нейраминидазы. На филогенетическом дереве гена гемагглютинаина изоляты A(H1N1pdm09) распределялись по 2 подгруппам внутри генетической клады 6В, в которую входят все штаммы данного подтипа, циркулировавшие на протяжении двух последних эпидемических сезонов. К первой подгруппе были отнесены 17 штаммов, ко второй — оставшиеся три. Изолят A(H3N2) по нуклеотидной последовательности гена гемагглютинаина был отнесен к генетической группе 3с.2а, в которую входит штамм A/Hong Kong/4801/2014, рекомендованный ВОЗ в качестве вакцинного на следующий эпидемический сезон.

237 выделенных изолятов подтипа A(H1N1pdm09) (в том числе все штаммы, выделенные из проб от фатальных случаев заболевания гриппом) были исследованы в РТГА с хорьковой референс-сывороткой, полученной против вакцинного штамма A/California/07/2009 (IRR, USA). Обратный титр референс-сыворотки в РТГА со штаммом A/California/07/2009 составил 2560, в то время как ее титр в реакции с участием выделенных нами изолятов варьировал в пределах от 640 до 2560, отличаясь, таким образом, от титра гомологичной пары не более чем в 4 раза, что позволяет считать исследованные изоляты антигенно-сходными с вакцинным штаммом.

Для дальнейшей антигенной характеристики изолятов A(H1N1pdm09) нами была получена поликлональная сыворотка

путем интраназального заражения хорька одним из выделенных штаммов данного подтипа A/Dagestan/1328/2015. Обратный титр полученной сыворотки в РТГА как с гомологичным штаммом, так и с вакцинным штаммом A/California/07/2009 составил 5120. Анализ сыворотки anti-A/Dagestan/1328/2015 в реакции нейтрализации с рядом изолятов A(H1N1pdm09)-подтипа в клеточной культуре MDCK показал наличие в ней высокого уровня нейтрализующих антител: титр сыворотки в реакции нейтрализации был сопоставим с титром в РТГА (см. табл.).

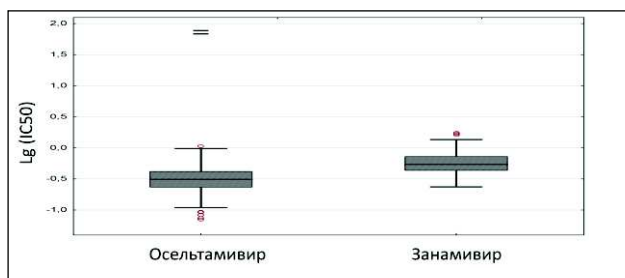
**Обратный титр сыворотки anti-A/Dagestan/1328 /2015
в реакции нейтрализации (доза вируса 100 ТЦИД₅₀)**

Штамм A(H1N1pdm09)	Титр
A/Dagestan/1328/2015	5120
A/Astrakhan/12/2016	2560
A/Cherkessk/4/2016	2560
A/Volgograd/763/2016	2560
A/КМАО/1/2015	1280

В целях определения лекарственной чувствительности циркулирующих штаммов 170 выделенных изолятов (в том числе все штаммы, выделенные из проб от фатальных случаев заболевания гриппом) были проанализированы в флуоресцентном тесте ингибирования нейраминидазы с двумя антинейраминидазными препаратами, одобренными для применения на территории РФ: осельтамивиром и занамивиром. В соответствии с диагностическими критериями рабочей группы ВОЗ по мониторингу за восприимчивостью вирусов гриппа к действию лекарственных средств (WHOAVWG), чувствительность к препарату считается сниженной, в случае если значение IC₅₀ исследуемого штамма не менее чем в 10 раз превосходит медиану значений IC₅₀ всех протестированных вирусов данного подтипа за текущий период.

Медиана полученных значений IC₅₀ осельтамивира для изолятов A(H1N1pdm09) составила 0,31 нМ. Были выявлены 2 изолята

A(H1N1pdm09), характеризующиеся выраженной резистентностью к действию данного препарата, чьи значения IC_{50} превосходили медиану более чем в 100 раз. Один из них был выделен из пробы, взятой на территории Северо-Западного федерального округа (ФО) у ребенка 2 лет с диагнозом ОРВИ ($IC_{50} = 77,51 \text{ нМ}$). Второй изолят выделен из пробы, взятой на территории Сибирского ФО у пациента с диагнозом нозокомиальная пневмония; **болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека, стадия 4Б; вирусный гепатит С** ($IC_{50} = 68,76 \text{ нМ}$). Оба случая заболевания завершились летальным исходом; информация по факту приема пациентами осельтамивира не была предоставлена. Медиана значений IC_{50} занамивира для изолятов A(H1N1pdm09) составила $0,54 \text{ нМ}$, все исследованные изоляты оказались чувствительными к действию данного препарата (см. рис.).



Значения $lg(IC_{50})$ для изолятов A(H1N1pdm09). « » — интервал I-III квартили с медианой; «—» — крайние точки, соответствующие резистентным штаммам

Три изолята вируса гриппа A(H3N2) также были исследованы в тесте ингибирования нейраминидазы. Значения IC_{50} как осельтамивира, так и занамивира для них не превосходили 1 нМ , что, в соответствии с литературными данными, соответствует средним значениям чувствительных штаммов A(H3N2).

Заключение

В эпидемическом сезоне 2015–2016 на территории РФ, как и в других странах Северного полушария, преобладали штаммы вируса гриппа А подтипа H1N1pdm09. Циркулировавшие штаммы характе-

ризовались антигенной мономерностью: в серологических реакциях для них была характерна кросс-реактивность как с вакцинным штаммом, так и между собой, в связи с чем пересмотр A(H1N1pdm09)-компонента вакцины, не менявшегося ВОЗ с 2010 года, по-прежнему остается нецелесообразным. Исследование полученной поликлональной хорьковой сыворотки свидетельствует о высокой иммуногенности штамма A/Dagestan/1328/2015, способного индуцировать синтез не только тормозящих агглютинацию, но и нейтрализующих антител в высоких титрах. Определение чувствительности циркулирующих штаммов к действию антинейраминидазных препаратов показало, что 168 из 170 исследованных изолятов (99 %) обладали нормальной чувствительностью к действию как осельтамивира, так и занамивира. Лишь 1 % штаммов оказался резистентен к осельтамивиру, сохраняя при этом восприимчивость к занамивиру. Полученные результаты о частоте встречаемости резистентных штаммов соответствуют результатам, опубликованным сотрудничающими центрами ВОЗ по гриппу в США и Европе. В связи с низкой частотой встречаемости резистентных штаммов в циркуляции может быть рекомендовано применение антинейраминидазных препаратов в целях лечения гриппа на ранних сроках развития заболевания.

**ЛАБОРАТОРНАЯ МОДЕЛЬ НА ОСНОВЕ
ИММУНОДЕФИЦИТНОЙ МЫШИ ЛИНИИ SCID
ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ
ОТ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ**

**LABORATORY MODEL BASED ON IMMUNODEFICIENT SCID
MICE TO ASSESS THE EFFICACY OF CHEMOTHERAPY
DRUGS AGAINST SMALLPOX**

К. А. Титова, Ал.А. Сергеев, А. С. Кабанов, Л. Е. Булычев,
Ар. А. Сергеев, Д. О. Галахова, А. С. Овчинникова,
Л. Н. Шишкина, О. С. Таранов, А. П. Агафонов, А. Н. Сергеев

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

K.A. Titova, Al.A. Sergeev, A. S. Kabanov, L. E. Bulychev, Ar.A. Sergeev,
D.O. Galahova, A. S. Ovchinnikova, L. N. Shishkina, O. S. Taranov,
A. P. Agafonov, A. N. Sergeev
SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Проведена экспериментальная оценка чувствительности мышей линии SCID к вирусу натуральной оспы, динамики его накопления в органах и тканях этих животных и патоморфологических изменений в них. На примере двух химиопрепаратов продемонстрирована возможность использования мышей линии SCID и штамма Ind-3a вируса натуральной оспы в качестве лабораторной модели для оценки эффективности химиопрепаратов от натуральной оспы.

Abstract

It was conducted the experimental evaluation of SCID mice sensitivity to variola virus, the dynamics of virus accumulation in the animal organs and tissues and pathological changes in them. On the example of the two preparations, the possibility of using SCID

mice and Ind-3a strain of variola virus as a laboratory model for assessing the efficacy of chemotherapy drugs against smallpox was demonstrated.

В настоящее время в качестве модельных животных для натуральной оспы при оценке эффективности противовирусных препаратов используется лишь приматы: макаки циномоглус (Huggins et al., 2009; Mucker et al., 2013). Данное исследование было направлено на изучение возможности применения с этой целью мышей линии SCID, обладающих тяжелым комбинированным иммунодефицитом.

Интраназальное (и/н) введение инбредным разнополым 18–21-суточным мышам линии SCID вируса натуральной оспы (ВНО) даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 lg БОЕ (бляшкообразующие единицы), не вызвало появления каких-либо внешних клинических признаков заболевания. В связи с этим с 3-кратным повтором проведено исследование на и/н инфицированных мышах разными дозами ВНО по оценке ИД₅₀ (50 %-я инфицирующая доза), рассчитанной с учетом регистрации данных о наличии вируса в легких через 4 сут после заражения. Значение этого показателя составило 3,5±0,7 lg БОЕ. С учетом того, что в легких апплицируется только 10 % вирусосодержащего материала, введенного и/н способом, то ИД₅₀ ВНО для мышей должна быть существенно ниже (на 1,0 lg) и составить 2,5±0,7 lg БОЕ. Это свидетельствует об относительно высокой чувствительности данного вида животных к ВНО, приближающейся к таковой у человека: до 1,0 lg жизнеспособных вирусных частиц (Дроздов и др., 1987; Огарков, Гапченко, 1975; Замедянская и др., 2016).

Проведено изучение диссеминации ВНО в организме мышей через 1, 2, 3, 4, 5 и 7 сут после и/н инфицирования дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀).

По данным табл. 1 отмечено, что, кроме органов респираторного тракта, ни один из исследованных биоматериалов от мышей не проявил своей способности к размножению вируса в течение всего срока наблюдения. В этом плане данные животные воспроизводит первое звено инфекционного процесса у человека при натуральной оспе. При проведении световой и электронной микроскопии органов и тканей этих животных были зарегистрированы только в органах респираторного тракта.

раторного тракта воспалительно-пролиферативные и некротические изменения, которые напоминали таковые у людей при натуральной оспе (Councilman et al., 1904; Bras, 1952; Cann et al., 2013).

Таблица 1

Данные по динамике накопления штамма Ind-3a вируса натуральной оспы в биоматериалах* от иммунодефицитных мышей линии SCID, интраназально (и/н) инфицированных дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀)

Вид биоматериалов от мышей	Концентрация вируса (lgБОЕ/мл, $M \pm I_{95}$, n=4) в биоматериалах от мышей через разные промежутки времени (сут) после заражения:					
	1	2	3	4	5	7
Клетки крови	< 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
Головной мозг	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Носовая перегородка со слизистой	< 0,4	< 0,40	$2,7 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	< 0,4
Трахея	< 0,4	$3,0 \pm 0,1$	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Легкие	$3,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,2$
Пищевод	< 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
Селезенка	< 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
Двенадцатиперстная кишка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4

Примечание. ИД₅₀ — 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких через 4 суток п.з.; * — органы и ткани в составе 4 %-х (по объему) гомогенатов, а также сыворотка крови; М — среднее; I₉₅ — 95 % доверительный интервал; n — число повторов определения объединенных проб от 4 мышей; <0,4 — величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования.

Проведена оценка эффективности профилактического действия препаратов на мышах, наблюдая за величинами концентраций ВНО в легких животных через 4 сут после и/н заражения дозой 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀), результаты которой представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Данные протективной активности химиопрепаратов
в отношении вируса натуральной оспы (штамм Ind-3a)
через 4 суток после интраназального инфицирования мышей
линии SCID в дозе 5,2 lg БОЕ (50 ИД₅₀)**

Наименование показателя	Различные препараты, вводимые перорально ежедневно однократно за 1 сут до и в день заражения и в течение 3 сут после заражения (п.з.):		
	НИОХ-14	ST-246	плацебо
Суточная доза препаратов	50 мкг/г	50 мкг/г	0,2 мл/мышь
Кол-во животных в группах	10	9	8
Титр вируса в легких (в lg БОЕ/легкие, $M \pm I_{95}$) у каждой мыши через 4 сут после инфицирования	2,1 $\pm$ 2,2	2,4 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,8
	1,3 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,9
	2,3 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,0
	2,2 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3
	2,7 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,1
	< 0,4	2,3 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,0
	< 0,4	2,3 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,4
	< 0,4	< 0,4	3,3 $\pm$ 0,9
	< 0,4	< 0,4	
Титр вируса в легких мышей через 4 сут п.з., lg БОЕ/легкое ($M \pm I_{95}$)	2,1 $\pm$ 0,6* (n=5)	2,3 $\pm$ 0,1* (n=7)	3,3 $\pm$ 0,2 (n=8)
ИППВ в легких мышей в lg	1,2	1,0	—
Кол-во (%) инфицированных мышей через 4 сут п.з.	5 (50)**	7 (78)	8 (100)
КЗИ в %	50	22	—

Примечание. ИД₅₀ — 50 %-я инфицирующая доза, рассчитанная по наличию вируса в легких через 4 суток п.з.; n — число животных; М — среднее; I₉₅ — 95 %-й доверительный интервал; плацебо — раствор метилцеллюлозы с твином-80, используемый для суспензирования химиопрепаратов; <0,4 — порог чувствительности метода титрования (0,4 lg БОЕ/легкие); * — достоверное отличие от контроля (двусторонний Т-тест Стьюдента с одинаковыми дисперсиями); ИППВ — индекс подавления накопления вируса = lg титра вируса в легких контрольной группы животных — lg титра вируса в легких опытной группы животных; ** — достоверное отличие от контроля (точный тест Фишера р одностороннее <0,05); КЗИ — коэффициент защиты от инфицирования = 100 % × (% животных в контроле с наличием вируса в легких — % опытных животных с наличием вируса в легких) / % животных в контроле с наличием вируса в легких.

Отмечено, что количество инфицированных мышей, обработанных препаратами ST-246 и НИОХ-14 и и/н зараженных ВНО, через 4 сут после заражения достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0,05$). Полученные нами результаты доказывают, что ST-246 и НИОХ-14 подавляют продукцию ВНО в легких у инфицированных мышей, что согласуется с данными об эффективности этих препаратов в отношении различных ортопоксвирусов (Кабанов и др., 2013; Mucker et al., 2013; Sergeev et al., 2015).

Таким образом, мышь иммунодефицитной линии SCID может быть с успехом использована в качестве модельного животного для натуральной оспы с целью оценки эффективности противовирусных химиопрепаратов.

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА РАСТЕНИЙ ЮГО-ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

ANTIVIRAL PROPERTIES OF THE PLANTS OF SOUTHWEST SIBERIA

Е. И. Филиппова ¹, И. Е. Лобанова ², Г. И. Высочина ²,
О. Ю. Мазурков ¹, Н. А. Мазуркова ¹

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

² *ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН*

E. I. Filippova ¹, I. E. Lobanova ², G. I. Vysochina ²,
O. Yu. Mazurkov ¹, N. A. Mazurkova ¹

¹ SRC VB «Vector», Russia

² CSBG, SB RAS, Russia

e-mail: filippova_ei@vector.nsc.ru

Аннотация

Проведено исследование противовирусной активности в отношении вируса гриппа субтипов A/Aichi/2/68 (H3N2) (человека) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) (птиц) у 70 видов растений 47 родов 14 ботанических семейств из природной флоры Юго-Западной Сибири. Выявлены виды, обладающие активностью разной степени в отношении каждого из субтипов вируса гриппа.

Abstract

Research on antiviral activity concerning a virus of flu of the subtypes A/Aichi/2/68 (H3N2) (person) and A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) (birds) at 70 species of plants 47 genera of 14 botanical families from natural flora of Southwest Siberia is conducted. Species possessing by activity of different degree concerning each of flu virus subtypes are revealed.

Одной из важнейших проблем современной медицины является поиск эффективных средств против вирусных инфекций, в частности — против гриппа, который составляет 95 % всех инфекционных заболеваний. Сложность проблемы заключается в способности вирусов гриппа мутировать и «привыкать» к применяемым в современной практике лекарственным средствам. Противогриппозные препараты в настоящее время представлены химическими соединениями двух групп, отличающихся по мишеням и механизму действия в жизненном цикле вируса гриппа. При этом, помимо того, что обе группы соединений имеют свои недостатки, можно отметить и их общий недостаток — быстрое формирование устойчивости штаммов вируса гриппа к препаратам. В связи с этим в последние годы во многих лабораториях проводятся исследования по созданию новых более эффективных противогриппозных препаратов как синтетического, так и природного происхождения.

Цель исследования — изучение противогриппозной активности экстрактов высших растений, произрастающих на территории Юго-Западной Сибири.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили экстракты, полученные методами водного и этанольного извлечений БАВ из надземных и подземных частей 70 видов растений, собранных в фазу цветения.

Определение цитотоксичности (максимально переносимых концентраций — МПК) и противовирусной активности исследуемых образцов проводили на перевиваемой линии клеток MDCK, полученной из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Моделью экспериментальных животных служили мыши аутбредной популяции ICR, полученные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

В экспериментах по тестированию противовирусной активности растительных экстрактов использовали штаммы вируса гриппа А: высокопатогенный штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированный к лабораторным мышам штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Результаты исследования

Установлено, что большинство водных и этанольных экстрактов являются малотоксичными для линии клеток MDCK. В результате исследования противогриппозного действия растительных экстрактов были выявлены виды, обладающие активностью разной степени в отношении каждого из субтипов вируса гриппа. В целом, проявление противовирусной активности экстрактов зависело от таксономической принадлежности вида растения и его части, используемой для извлечения. Обнаружение противовирусной активности экстрактов высших растений из природной флоры Юго-Западной Сибири открывает перспективу создания на их основе противогриппозных фитопрепаратов, обладающих профилактическим и лечебным эффектом.

ЗАВОЗНЫЕ СЛУЧАИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

IMPORTED CASES OF DENGUE FEVER IN RUSSIAN FEDERATION

Е. В. Чаусов, И. В. Плясунова, Е. В. Протопопова, М. Ю. Карташов,
А. О. Семенцова, В. А. Терновой, Е. И. Сергеева, А. Н. Шиков,
С. А. Берилло, О. К. Демина, В. Б. Локтев, А. П. Агафонов

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Новосибирская область

E. V. Chausov, I. V. Plyasunova, E. V. Protopopova, M. Ju. Kartashov,
A. O. Sementsova, V. A. Ternovoi, E. I. Sergeeva, A. N. Shikov,
S. A. Berillo, O. K. Demina, A. P. Agafonov
SRC VB "Vector", Russia

e-mail: echausov@vector.nsc.ru

Аннотация

Лихорадка денге — вирусное заболевание, передающееся человеку через укусы комаров. В Российской Федерации лихорадка денге

не является эндемичной, однако в связи с ухудшением эпидемиологической обстановки по лихорадке денге в мире и увеличением числа российских граждан, посещающих эндемичные регионы, завозные случаи заболевания являются актуальной проблемой. При исследовании сывороток крови от 312 пациентов с подозрением на лихорадку денге, посещавших эндемичные регионы, маркеры заболевания (NS1-антиген, антитела классов IgM и IgG) были выявлены в 131 образце (42 %). С использованием культуры клеток C6/36 (культура клеток тканей личинки комара *Aedes albopictus*) проведено выделение 4 штаммов всех основных субтипов вируса денге.

Abstract

Dengue fever is a mosquito-transmitted viral disease. Russian Federation is not endemic for dengue fever, but due to the deterioration of the epidemiological situation for dengue fever in the world and the increasing number of Russian citizens visiting endemic regions, imported cases of the disease are an urgent problem. Among 312 serum samples from patients suspected to dengue fever (visited endemic regions) specific markers (NS1-antigen, IgM and IgG specific antibodies) have been identified in 131 samples (42 %). Using cell culture C6/36 (larvae tissue of the mosquito *Aedes albopictus*) all 4 dengue virus subtypes were isolated (3–4 passages).

Лихорадка денге — вирусное заболевание, передающееся человеку через укусы комаров. Вирус денге является представителем семейства *Flaviviridae* и имеет четыре субтипа, каждый из которых способен вызвать заболевание у человека. Лихорадка денге является эндемичной более чем для 100 стран Африки, Америки, Восточного Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана. В Российской Федерации лихорадка денге не является эндемичной, однако в связи с ухудшением эпидемиологической обстановки по лихорадке денге в мире и увеличением числа российских граждан, посещающих эндемичные регионы, завозные случаи заболевания являются актуальной проблемой. Первые завозные случаи заболевания денге в РФ были зарегистрированы в 2010 году (Берилло С. А. и др., 2012).

С мая 2011 по август 2016 года в ГНЦ ВБ «Вектор» методом иммунохроматографии (Dengue NS1 Ag + Ab Combo Test, Standard Diagnostics Inc., Корея) были исследованы сыворотки крови от 312 пациентов с подозрением на лихорадку денге. Маркеры заболевания (NS1-антиген, антитела классов IgM и IgG) были выявлены в 131 образце. Из них 93 пациента накануне заболевания находились в Таиланде, 30 — во Вьетнаме, 3 — на острове Бали, по 1 пациенту — в Мексике, Индонезии, Доминиканской Республике и на Филиппинах.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана диагностическая система, основанная на методе обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Вектор-ПЦРв-Денге-RG» (регистрационное удостоверение №РЗН 2016/4633), с помощью которой РНК вируса денге была выявлена в сыворотках крови от 45 пациентов. Генотипирование этих клинических вариантов проводили определением нуклеотидных последовательностей участка (260 п.н.) 5'-нетранслируемой области вирусной РНК и сравнением их с известными последовательностями геномов четырех субтипов вируса денге из международной базы данных GenBank. У 20 пациентов, прибывших из Таиланда, Вьетнама, Бали, Доминиканы, был определен субтип 1 вируса денге, субтип 2 — у 10 пациентов, вернувшихся из Таиланда, Вьетнама, Мексики, Индонезии и Филиппин, субтип 3 — у 8 пациентов, посещавших Таиланд и Вьетнам, субтип 4 — у 6 пациентов, побывавших в Таиланде. У одного пациента, прибывшего из Таиланда, была определена микст-инфекция субтипами 1 и 2.

Для одного клинического варианта вируса денге нами была определена полная нуклеотидная последовательность, опубликованная в международной базе данных GenBank под номером KF887994.1.

С использованием культуры клеток C6/36 (культура клеток тканей личинки комара *Aedes albopictus*) проведено выделение штаммов всех 4 субтипов вируса денге. Наличие вируса в культуре подтверждалось в ОТ-ПЦР. Культура клеток Vero (культура клеток почки зеленой мартышки) оказалась менее восприимчивой к вирусу денге — в большинстве случаев вирус элиминировался из культуры клеток к 3 пассажу, так что вирусная РНК не обнаруживалась в ОТ-ПЦР.

Выделенные штаммы депонированы в коллекцию ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ*

RECOMBINATION ANALYSIS AFRICAN SWINE FEVER VIRUS STRAINS

М. В. Шкаликова, Г. С. Бурмакина,
К. А. Мима, И. А. Титов, А. С. Малоголовкин

ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

M. V. Shkalikova, G. S. Burmakina,
K. A. Mima, I. A. Titov, A. S. Malogolovkin
VNIIVVIM, Russia

e-mail: masha67111@mail.ru

Аннотация

Вирус африканской чумы свиней является ДНКсодержащим вирусом семейства Asfarviridae и обладает относительно высокой частотой гомологичной рекомбинации. Аминокислотные последовательности двух протеинов P72 и CD_{2v} (EP402R) от 40 штаммов вируса АЧС были использованы для поиска рекомбинационных событий. В результате биоинформатического анализа определено 20 штаммов — рекомбинантов. Основная часть сайтов рекомбинации приходится на область высоко варибельного гена CD_{2v} (EP402R). Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего анализа эволюционной изменчивости в геномах вируса АЧС.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта №15-34-20995, а также гранта Президента РФ МК-6875.2015.4

Abstract

African swine fever virus is a DNA-containing virus of the family *Asfarviridae* and has a relatively high frequency of homologous recombination. The amino acid sequences of the two proteins P72 and CD_{2v} (EP402R) from 40 strains of the ASF virus were used to find recombination events. As a result of bioinformatics analysis 20 recombinants strains are identified. The major part of recombination sites occurs in the highly variable region of CD_{2v} gene (EP402R). The results can be used for further analysis of evolutionary variation in the genomes of ASF virus.

Рекомбинация, как процесс обмена генетической информацией между нуклеотидными последовательностями, является распространенным явлением для многих вирусов. Тем не менее, в некоторых вирусах события рекомбинации, основанные на имеющихся геномных последовательностях, обнаружены редко, например, у вирусов гриппа А, В и С и вируса чумы плотоядных (Han et al., 2008; McCarthy et al., 2007).

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) является ДНКсодержащим вирусом семейства *Asfarviridae*, который вызывает контагиозную смертельную болезнь свиней. В настоящее время эволюция некоторых генов этого вируса не широко изучена. По данным Van der Walt et al., 2009, учитывая общую рекомбинацию многих вирусов и большое количество последовательностей генов вируса АЧС, опубликованных в NCBI, мы можем ожидать, что увидим некоторые новые доказательства рекомбинации, происходящие в геномах вируса АЧС. Основываясь на наблюдениях Chapman et al., 2011, можно предположить, что процесс рекомбинации может присутствовать в геноме АЧС.

Целью данной работы являлось предсказать наличие процессов рекомбинации у штаммов вируса африканской чумы свиней с использованием методов биоинформатического анализа.

Аминокислотные последовательности двух протеинов P72 и CD_{2v} (EP402R) от 40 штаммов были получены из международной базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сконкатенированы. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения MUSCLE (Edgar, 2004).

Для кодон зависимого нуклеотидного выравнивания использовали PAL2NAL (<http://www.bork.embl.de/pal2nal>). Выровненные пары последовательностей кластеризовали по идентичности на веб-сервере CD — HIT — EST (<http://cd-hit.org>).

Обнаружение событий гомологичной рекомбинации проводили с использованием программного обеспечения RDP (Recombination Detection Program) (Martin and Rybicki, 2010), которое содержит ряд алгоритмов обнаружения рекомбинации, в том числе GENECONV, Bootscan / Rescan, Chimaera, MaxChi, SiScan, 3Seq и RDP. Достигаемый уровень значимости был принят за 0,05 и использовался для идентификации последовательностей, значение cut-of которых потенциально ниже по сравнению с рекомбинантным предком, что и определяет предполагаемых рекомбинантов.

Чтобы избежать ложноположительных результатов, проводили филогенетический анализ рекомбинации (Boni et al., 2008; Liu et al., 2010).

Для того чтобы узнать эволюционное расстояние, учитывали, что с течением времени возрастает число скрытых замещений. Чем больше различий между нуклеотидными последовательностями, тем больше прошло времени с момента начала аккумуляции таких изменений, как инсерции и делеции. Для определения числа синонимичных (синонимичная дистанция, dS) и несинонимичных замен (несинонимичная дистанция, dN) на сайт, а также числа потенциально синонимичных и несинонимичных сайтов для каждого кодона на основании гипотезы о равных частотах всех нуклеотидных замен использовался пакет программы SNAP (www.hiv.lanl.gov) (Synonymous Non-synonymous Analysis Program).

При анализе 40 изолятов вируса АЧС было выявлено 21 возможное событие рекомбинации. При этом у 17 последовательностей (AM712239.1, FN557520.1, AY261360.1, KP055815.1, NC001659.2, KM111294.1, AM712240.1, KM262844.1, KM262845.1, KJ526367.1, KJ526370.1, KJ671547.1, KJ671548.1, KJ671544.1, KJ526362.1, KJ526371.1, KJ526360.1) не было обнаружено ни одного сигнала рекомбинации.

Основную часть предполагаемых штаммов — рекомбинантов обнаруживали из стран Восточной и Западной Африки, что объясняет

большое количество вспышек, новых изолятов и наличие нескольких векторов болезни. Единичные рекомбинационные события выявлены в изолятах вируса АЧС из Грузии (FR682468.1), Португалии (AF301537.1) и Швейцарии (KJ671549.1).

Проведя отбор выявленных сайтов рекомбинации с учетом результата консенсуса программ RDP, было окончательно определено 20 штаммов и изолятов — рекомбинантов вируса АЧС. Все выявленные случаи рекомбинации подтверждены топологией древа. Основная часть сайтов рекомбинации приходится на область высоко вариабельного неструктурного гена EP402R. Также, мы можем наблюдать зависимость, что у изолятов с 95 % идентичности не наблюдается сигналов рекомбинации.

При анализе синонимичных и несинонимичных замен количество синонимичных замен на синонимичный сайт преобладает над количеством несинонимичных на несинонимичный сайт $0.1731 > 0.1229$ ($d_s > d_n$, $p_s > p_n$). При подсчете соотношения dN/dS значение составляет $0,7099 < 1$. Это свидетельствует об очищающем (стабилизирующем) отборе на уровне нуклеотидных последовательностей.

Настоящее исследование показало, что многочисленные статистические методы должны быть использованы для того, чтобы точно идентифицировать события рекомбинации. Результаты анализа свидетельствуют об относительно высокой частоте гомологичной рекомбинации у вируса АЧС. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего анализа эволюционной изменчивости и послужить выявлению таргетных участков в геномах вируса АЧС.

РАЗДЕЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

N- АЦИЛДОФАМИНЫ ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ PC12 ЧЕРЕЗ НЕКЛАССИЧЕСКИЙ КАННАБИНОИДНЫЙ РЕЦЕПТОР HE-CB1-HE-CB2 *

**N-ACYL DOPAMINES INDUCE APOPTOSIS IN PC12 CELL LINE
VIA THE O-1918-SENSITIVE NON-CB1-NON-CB2 RECEPTOR**

А. М. Ашба, М. Г. Акимов, Н. М. Грецкая, В. В. Безуглов

*ФГБУН Институт биоорганической химии
им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*

A. M. Ashba, M. G. Akimov, N. M. Gretskaia, V. V. Bezuglov
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian
Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: alyafonya@mail.ru

Аннотация

N-ацилдофамины (NADA) — биогенные конъюгаты дофамина с длинноцепочечными жирными кислотами. NADA проявляют свой-

* Работа была частично поддержана грантами Президента РФ МК-3842.2015.4 и РФФИ № 16-04-00729а.

ства агонистов ванилоидного рецептора TRPV1 и каннабиноидного рецептора CB1, а также ряда других рецепторных белков [1]. NADA индуцируют гибель раковых клеток различного гистологического происхождения с полулетальными дозами в диапазоне 2–50 мкм. Эта активность зависит от структуры остатка жирной кислоты и модификации дофамина [2], и, таким образом, является специфической. Тем не менее, молекулярная мишень NADA, обеспечивающая индукцию гибели клеток, до сих пор неизвестна.

Abstract

Dopamine amides of long chain fatty acids (NADA) are a family of endogenous mammalian lipids with an unknown function; they are anti-proliferative for many cancer cell lines. The aim of this work was to identify the NADA receptor responsible for cell death induction. Materials and Methods: PC12 cells were treated with NADA in combination with various receptor blockers for 18 h, after which cell viability and apoptosis induction were assessed using the MTT test, caspase activity assay, DNA laddering assay and ApoTRACE accumulation. Results: NADA induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cell line, and this activity was blocked only by O-1918, a non-CB1-non-CB2 receptor antagonist. Conclusion: N-acyl dopamines induce apoptosis in the PC12 cell line by activation of the surface non-CB1-non-CB2 receptor.

Цель данной работы — определить вид клеточной смерти и идентифицировать рецептор NADA в клеточной линии феохромоцитомы PC12.

Линию клеток PC12 культивировали в условиях, рекомендованных АТСС, с использованием 7,5 % фетальной бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия). Клетки обрабатывали NADA в сочетании с различными блокаторами рецепторов в течение 18 ч, после чего жизнеспособность клеток и индукцию апоптоза оценивали с помощью МТТ-теста, анализа активности каспаз, анализа фрагментации ДНК и накопления ApoTRACE (Sigma-Aldrich, США).

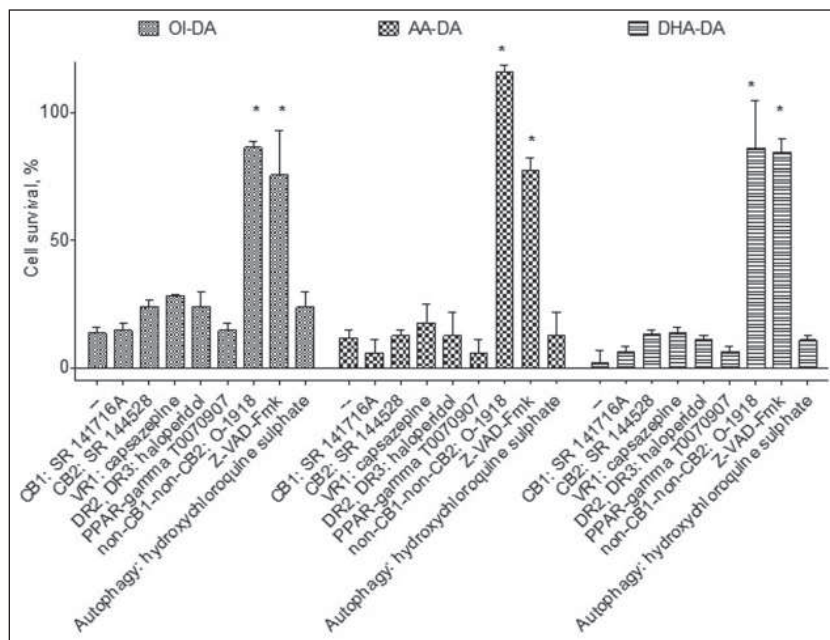
Для фармакологической блокады рецептора на плазмалемме клетки инкубировали с блокатором в течение 3-х дней, промывали свежей

средой и добавляли NADA на 1 ч, после чего заменяли среду свежей на 24 часа и оценивали жизнеспособность клеток.

Установлено, что минимальное время инкубации с NADA, достаточное для индукции гибели клеток, составляло 1 ч. Предварительная обработка с ингибитором аутофагии гидроксихлорохином (Tocris, США) [3] не влияла на цитотоксичность NADA, в то время как панкаспазный ингибитор Z-VAD-Fmk (Tocris, США) предотвращал гибель клеток. Исходя из этого, сделано предположение, что NADA индуцируют апоптоз трансформированных клеток, что подтверждено с помощью анализа активности каспаз, набора ApoTRACE и анализа фрагментации ДНК. Наблюдаемая активация каспаз 3 и 9, вместе с полученными нами ранее данными о способности NADA вызывать накопление активных форма кислорода [4], указывает на запуск апоптоза через внутренний путь активации.

Для идентификации рецептора NADA, отвечающего за индукцию апоптоза, клетки предварительно проинкубировали с набором блокаторов различных рецепторов (рис. 1). Единственным активным было вещество O-1918 (Sigma-Aldrich, США) — блокатор рецепторов группы не-CB1-не-CB2. Для дальнейшего подтверждения участия O-1918-чувствительного рецептора в цитотоксическом действии NADA применили метод фармакологической блокады под действием этого ингибитора. При этом цитотоксичность NADA существенно снижалась, что подтверждает участие рецептора, чувствительного к O-1918, в индукции апоптоза под действием NADA. Нокаут гена O-1918-чувствительного рецептора продемонстрировал тот факт, что NADA индуцируют апоптоз путем активации неклассического каннабиноидного не-CB1-не-CB2 рецептора.

Таким образом, нами впервые показано, что NADA индуцируют апоптоз путем активации неклассического каннабиноидного не-CB1-не-CB2 рецептора. Следует отметить, что данное название относится к группе белков (GPR119, GPR55, GPR18) [5], и дифференциация наблюдаемых эффектов NADA между ними, а также дальнейшее изучение внутриклеточных путей передачи сигнала являются предметом последующих работ.



Влияние блокаторов рецепторов на цитотоксичность дофаминовых амидов арахидоновой (AA-DA), докозагексаеновой (DHA-DA) и олеиновой (OI-DA) кислот. Одновременное добавление; NADA, 3 мкМ, SR 141716A (CB1), 0,5 мкМ, SR 144528 (CB2), 0,5 мкМ, капсазепин (VR1), 2 мкМ, галоперидол (DR2, DR3), 10 мкМ, T0070907 (PPAR-gamma), 1 мкМ, Z-VAD-fmk, 50 мкМ, гидроксихлорохин сульфат, 10 мкМ, O-1918 (non-CB1-non-CB2), 3 мкМ. МТТ-тест, время инкубации 18 часов, среднее $\pm$ стандартное отклонение; * — статистически значимое отличие от NADA без блокаторов, $p < 0,05$ (ANOVA с пост-тестом Туки)

Литература

1. Akimov MG, Bezuglov VV. N-Acylated Dopamines: A New Life for the Old Dopamine. In: Kudo E, Fujii Y, editors. Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects. NY: Nova Science Publishers; 2012. P. 49–80.
2. Akimov MG, Gretskaya NM, Zinchenko GN, Bezuglov VV. Cytotoxicity of endogenous lipids N-acyl dopamines and their possible metabolic derivatives for human cancer cell lines of different histological origin. Anticancer Res. 2015;35(5):2657–61.

3. Lee H-O, Mustafa A, Hudes GR, Kruger WD. Hydroxychloroquine Destabilizes Phospho-S6 in Human Renal Carcinoma Cells. PLoS One. 2015;10(7):e0131464.

4. Ashba AM, Akimov MG, Gretskey NM, Bezuglov VV. N-Acyl Dopamines Induce Cell Death in PC12 Cell Line via Induction of Nitric Oxide Generation and Oxidative Stress. Doklady Biochemistry and Biophysics. 2016;467:1–4.

5. Abood ME, Sorensen RG, Stella N. Endocannabinoids : actions at non-CB1. New York: Springer; 2013.

**РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОНКОЛИТИЧЕСКОГО
ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С УВЕЛИЧЕННОЙ
ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРИОНОВ***

**DESIGN OF RECOMBINANT ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS
THAT PRODUCE INCREASED AMOUNT OF EXTRACELLULAR
ENVELOPED VIRAL FORMS**

Т. В. Бауэр, Т. В. Трегубчак, Р. А. Максютков, С. Н. Щелкунов

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

T. V. Bauer, T. V. Tregubchak, R. A. Maksyutov, S. N. Shchelkunov
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",
Rospotrebnadzor, Russia

e-mail: bauehr-tatjana@rambler.ru

Аннотация

Штаммы вируса осповакцины различаются по эффективности формирования внеклеточных оболочечных вирионов, обеспечивающих большую эффективность распространения вируса и обладаю-

* Работа поддержана грантом РФФ (грант № 16-15-10101).

щих устойчивостью к иммунному ответу организма. Данное различие обусловлено аминокислотными заменами K151E и D110N в составе мембранного гликопротеина A34. Введение этих замен в белок A34 в составе вирусов осповакцины может усилить онколитический потенциал таких вирусов.

Abstract

Vaccinia virus strains are differ in their efficiency of formation extracellular enveloped viral forms that provide greater efficiency of virus spread and resistant to the host immune response. Two amino acid substitutions K151E and D110N of the membrane glycoprotein A34 determine these differences. Administration of these substitutions in vaccinia virus A34 protein may enhance oncolytic potential such viruses.

В настоящее время значительное внимание уделяется потенциальным возможностям использования вирусов в борьбе с онкологическими заболеваниями. Одним из наиболее изученных вирусов, используемых для создания онколитических препаратов, является представитель рода ортопоксвирусов — вирус осповакцины (ВОВ). Так в настоящее время онколитические препараты на основе ВОВ проходят клинические испытания в США. Однако, существует необходимость создания панели онколитических вирусов, для комплексного использования в клинике, а также для того чтобы иметь возможность произвести замену или модификацию препарата в случае, если у больного возникает резистентность при терапии одним из препаратов.

Показано, что штаммы ВОВ различаются по эффективности формирования внеклеточных вирионов, покрытых липопротеидной оболочкой, которая *обеспечивает распространение вируса в ткани и по кровеносному руслу в целом еще до лизиса исходной зараженной клетки и выхода из нее других антигенных форм вирионов*. На примере штаммов WR и IND-J ВОВ выявлено, что эффективность формирования внеклеточных вирионов зависит от аминокислотной последовательности мембранного гликопротеина A34 — наличие двух замен K151E и D110N в последовательностях белков обуславливает эти отличия. Ранее нами была получена перспективная основа для создания

онколитических препаратов — рекомбинантный BOB на основе штамма Л-ИБП, содержащий делеции генов, кодирующих тимидинкиназу и вирусный фактор роста, с одновременной встройкой гена, кодирующего гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Однако данный вирус не способен эффективно формировать внеклеточные вирионы, что обусловлено аминокислотной последовательностью белка A34. Целью данной работы являлось введение двух точечных нуклеотидных замен в гене A34R вируса осповакцины BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_VGF(-), приводящим к аминокислотным заменам K151E и D110N в мембранном гликопротеине A34. Введение данных замен позволить увеличить количество внеклеточных оболочечных форм, что может повысить онколитический потенциал такого вируса за счет более эффективного распространения вируса в ткани и по кровеносному руслу и, тем самым, увеличит вероятность поражения вирусом первичных опухолей и метастазов.

Методами генетической инженерии и ПЦР-мутагенеза нами была получена рекомбинантная плаزمиды интеграции, содержащая фрагмент вирусной ДНК с двумя введенными точечными нуклеотидными заменами в гене A34R BOB, приводящими к целевым аминокислотным заменам D110N и K151E.



Морфология бляшек, образуемых при заражении монослоя клеток CV-1 рекомбинантным BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_VGF(-)_A34R_(D110N, K151E): 1 — кометообразная бляшка, 2 — круглая бляшка

Посредством метода временной доминантной селекции был получен рекомбинантный BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_VGF(-)_A34R_(D110N и K151E).

Увеличение доли внеклеточных оболочечных вирионов характеризуется образованием специфичных по форме кометообразных бляшек, что было показано для полученного вируса (ссм. рис.).

Показано, что способность образовывать кометообразные бляшки BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_VGF(-)_A34R_(D110N, K151E) возросла в 1,9 раз по сравнению с исходным вариантом вируса, что свиде-

тельствует о повышении эффективности формирования внеклеточных оболочечных вирионов рекомбинантным ВОВ, содержащим аминокислотные замены D110N и K151E в составе мембранного гликопротеина A34.

Также выявлено, что в 2 раза повысилась эффективность формирования внеклеточных оболочечных вирионов в первые часы после заражения клеток линии CV-1 вирусом, содержащим введенные нами нуклеотидные замены.

Таким образом, полученный вирус, может стать более перспективной основой для создания онколитических вирусных препаратов, так как, возможно, обеспечить лучшее распространение вируса по организму и селективный лизис именно трансформированных клеток, обусловленный уже введенными и планируемыми к введению, модификациями генома. В дальнейшем будет изучен онколитический потенциал такого вируса в системах *in vitro* и *in vivo*.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ АРАБИДОПСИСА В ИМПОРТЕ ДНК

A STUDY ON ROLE OF ARABIDOPSIS MITOCHONDRIAL MEMBRANE PROTEINS IN DNA IMPORT

Т. А. Болотова, В. И. Тарасенко,
Ю. М. Константинов, М. В. Кулинченко

Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений СО РАН

T.A. Bolotova, V.I. Tarasenko, Y.M. Konstantinov, M.V. Koulinchenko,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry of the RAS, Russia

e-mail: bolotova_t.a@mail.ru

Аннотация

Условием нормального функционирования митохондрий высших эукариот является наличие у них мембранных систем транс-

порта макромолекул (белков и нуклеиновых кислот). В отличие от импорта белков и тРНК окончательных представлений о биологической роли и молекулярном механизме импорта ДНК в митохондрии эукариот пока не существует. Горизонтальный перенос генов, происходящий в растительные митохондрии с гораздо более высокой частотой, чем в ядерный и хлоропластный геномы, может быть связан с природной компетентностью этих органелл к активному поглощению ДНК. Процесс импорта ДНК в митохондрии может осуществляться с участием нескольких нерасшифрованных пока механизмов, имеющих специфичность в отношении длины и структуры транспортируемых молекул. С целью выявления потенциальных множественных механизмов транспорта молекул ДНК разной длины в митохондрии растений, мы провели исследование импорта ДНК в системе *in organello* с использованием митохондрий, изолированных из растений арабидопсиса, мутантных по белкам внешней митохондриальной мембраны TSPO и двух изоформ VDAC. Показано возможное участие этих мембранных белков в импорте субстратов ДНК разной длины.

Abstract

For normal functioning, mitochondria of the higher eukaryotes need membrane transport systems of the macromolecules (proteins and nucleic acids). In contrast to protein and tRNA import, a clear idea about biological role and molecular mechanism of the mitochondrial DNA import does not yet exist. The horizontal gene transfer in plant mitochondria, occurring at a much higher frequency than in the nuclear and chloroplast genomes, may be associated with the natural competence of these organelles for active DNA uptake. The process of DNA import into mitochondria may involve alternative mechanisms which could depend on length and structure of the transported molecules. To study potential multiple mechanisms of transport of the DNA molecules with different length into plant mitochondria, we used the *in organello* DNA import system into mitochondria isolated from Arabidopsis plants mutant for proteins of the outer mitochondrial membrane TSPO and two VDAC isoforms. We showed that these membrane proteins could be involved in import of the DNA substrates with different length.

Несмотря на то, что в составе своего генома митохондрии сохранили ограниченную генетическую информацию, для осуществления своих функций они нуждаются в импорте белков и нуклеиновых кислот. Импорт РНК имеет важное значение для экспрессии митохондриальных генов и их регуляции, в то время как компетенция митохондрий к поглощению ДНК, вероятнее всего, вносит вклад в динамику генома и эволюцию этих органелл. Ранее установлено [5], что в импорте ДНК в митохондрии участвуют порин (VDAC, от: Voltage Dependent Anion Channel) и адениннуклеотидтранслоказа (ANT, от: Adenine Nucleotide Translocase), белки наружной и внутренней мембраны соответственно. Однако дальнейшие исследования [2] показали, что этими белками не исчерпывается набор мембранных белков, способных осуществлять транслокацию ДНК в митохондрии, и что этот процесс может быть специфичным в отношении длины и структуры переносимых молекул [2, 4]. Целью работы являлось выявление и характеристика потенциальных множественных механизмов транспорта молекул ДНК разной длины в митохондрии растений.

В митохондриях животных одним из важных компонентов митохондриальной поры сдвига проницаемости, MPTP (от: Mitochondrial Permeability Transition Pore) является митохондриальный бензодиазепиновый рецептор PBR (от: Peripheral Benzodiazepine Receptor) или TSPO (от: Tryptophan-rich Sensory Protein), локализованный, главным образом, в наружной митохондриальной мембране [1, 6]. При определенных стрессовых ситуациях PBR/TSPO способен формировать транзитную пору (олигомерные комплексы с порином и ANT в местах контакта двух мембран), через которую может осуществляться транспорт ДНК. У растений локализация TSPO также связана с митохондриями [6], хотя, в отличие от животных, функции этого белка остаются малоизученными. Для изучения роли TSPO в импорте субстратов ДНК разной длины мы использовали гомозиготную линию арабидопсиса *tspo* с инактивированной функцией мембранного рецептора (кодируемым геном At2g47770). Показано, что растения *tspo* фенотипически не отличаются от растений дикого типа (*Columbia-0*). Для импорта в митохондрии, изолированные из

4-недельных проростков растений *Col-0* и *tspo* [7], были использованы флуоресцентно меченые фрагменты ДНК размером 109/269 п.н. и 852/1013 п.н. Анализ результатов импорта проводили согласно протоколам [2, 5]. Полученные данные позволяют сделать вывод, что митохондриальный мембранный белок TSPO, скорее всего, не играет существенной роли в импорте молекул ДНК малой длины (фрагментов ДНК ≤ 300 п.н.). Тем не менее, не исключено участие TSPO в импорте в митохондрии молекул ДНК средней длины (фрагментов ДНК >300 п.н.): мы не наблюдали статистически значимых различий в эффективности импорта в митохондрии *Col-0* и *tspo* в случае инкубации с органеллами 0,5–1 мкг фрагментов ДНК размером 852/1013 п.н., в случае использования для инкубации 2 мкг ДНК этого размера происходило ≈ 2 -кратное снижение поглощения ДНК митохондриями из линии *tspo* в сравнении с диким типом. Таким образом, TSPO может играть роль в процессе переноса ДНК в митохондрии, участвуя, по всей видимости, в одном из альтернативных механизмов импорта.

Как известно, VDAC совместно с белком внутренней митохондриальной мембраны ANT формирует транзитную пору MPTP в митохондриях растительного и животного происхождения, через которую может осуществляться импорт ДНК [5]. Наличие в составе внутренней мембраны других представителей суперсемейства митохондриальных переносчиков, обозначаемое как MCF [3] дает основания для предположения о полиморфизме MPTP: любой белок-представитель семейства MCF с участием различных изоформ VDAC способен формировать пору, через которую, в определенных условиях, может транслоцироваться ДНК. Одной из задач работы являлось изучение возможного вовлечения различных изоформ VDAC в процесс импорта ДНК в митохондрии растений. Мы использовали гомозиготные линии мутантов арабидопсиса с инактивированными генами At3g01280, At5g67500, At5g15090 и At5g57490, кодирующими изоформы митохондриального порина (VDAC1, VDAC2, VDAC3, VDAC4). Характерными особенностями мутантных растений трех линий, *vdac1*, *vdac2* и *vdac4*, были замедленный рост и более позднее цветение, а также частичная стерильность, при этом растения

мутантной линии *vdac3* не отличались от растений дикого типа. Для экспериментов по импорту субстратов ДНК разной длины (флуоресцентно или радиоактивно меченых фрагментов 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н.) были использованы линии *vdac1* и *vdac3*, для которых было получено достаточное для выращивания растений количество семян. Отсутствие как VDAC1, так и VDAC3 в наружной мембране митохондрий не оказывало влияния на эффективность импорта фрагмента малой длины (≤ 300 п.н.). Для фрагментов средней длины (> 300 п.н.) было отмечено увеличение интенсивности импорта (в 2–4 раза), как в митохондриях мутанта *vdac1*, так и мутанта *vdac3*. Поскольку инактивация изоформ порина, входящего в состав поры, осуществляющей перенос ДНК через митохондриальные мембраны [5], не снижает и не увеличивает эффективность импорта ДНК малой длины, данный механизм, вероятно, является лишь вспомогательным путем для транслокации в митохондрии ДНК этого размерного класса. При этом, отсутствие одной из изоформ порина, VDAC1 или VDAC3, по-видимому, может вызывать конформационные изменения в поре, способствуя более эффективной транслокации фрагментов средней длины. Исходя из этого, можно предположить, что VDAC выполняет регуляторную и/или барьерную роль в импорте ДНК.

Литература

1. Зоров Д. Б. Митохондриальный транспорт нуклеиновых кислот. Участие бензодиазепинового рецептора / Д. Б. Зоров // Биохимия. — 1996. Т. 61. Вып. 7. С. 1320–1332.
2. Клименко Е. С. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР / Е. С. Клименко, В. А. Милейко, Е. С. Морозкин, П. П. Лактионов, Ю. М. Константинов // Журнал «Биологические мембраны». 2011. Т. 28. № 3. С. 199–205.
3. Haferkamp I., and Schmitz-Esser, S. (2012) The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects, Front. Plant Sci., 3, doi: 10.3389/fpls.2012.00002.

4. Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement, *Pharm. Res.* 28 (2011) 2871–2882.

5. Koulintchenko M. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex / M. Koulintchenko, Yu. Konstantinov, A. Dietrich // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. № 6. P. 1245–1254.

6. Lindemann P. A novel *Arabidopsis thaliana* protein is a functional peripheral-type benzodiazepine receptor / P. Lindemann, A. Koch, B. Degenhardt, G. Hause, B. Grimm, V. Papadopoulos // *Plant and cell physiology.* 2004. V. 45. № 6. P. 723–733.

7. Sweetlove L.J. Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana* / L.J. Sweetlove, N.L. Taylor, C.J. Leaver / *Method in molecular biology.* 2007. Vol. 372. P. 125–136.

**ПОИСК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК
КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ МАССОВОГО
ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

**EPIGENETIC CELL-FREE DNA BIOMARKERS OF PROSTATE
CANCER: THE SEARCH BY MASSIVELY PARALLEL
SEQUENCING**

А. А. Бондарь ¹, А. М. Курищиков ¹, Е. С. Морозкин ^{1,2}, М. М. Зарипов ³,
М. Р. Кабилов ¹, В. Е. Войццкий ³, В. В. Власов ¹, П. П. Лактионов ^{1,2}

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

² *Новосибирский институт патологии кровообращения
им. Е. Н. Мешалкина, г. Новосибирск*

³ *Новосибирский областной онкологический диспансер,
г. Новосибирск*

A.A. Bondar ¹, A.M. Kurilshikov ¹, E.S. Morozkin ^{1,2}, M.M. Zaripov ³,
M.R. Kabilov ¹, V.E. Voytsitskiy ³, V.V. Vlassov ¹, P.P. Laktionov ^{1,2}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Academician E. N. Meshalkin Novosibirsk State Research
Institute of Circulation Pathology, Russia*

³ *Novosibirsk Regional Cancer Center, Novosibirsk, Russia*

e-mail: anya.a.bondar@gmail.com

Аннотация

Было выполнено бисульфитное секвенирование фрагментов генов GSTP1 и RNF219 в составе циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы крови здоровых доноров, больных доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы. Показано, что по

уровню метилирования одного из CpG-сайтов (для каждой мишени) можно достоверно различить группу раковых больных от других групп. Впервые была рассмотрена значимость корреляции статуса метилирования на молекулярном уровне. Согласно ROC кривым для гена GSTP1 чувствительность данного теста составляет 92 % и специфичность 100 %, а для гена RNF219 — 100 % и 66 % соответственно.

Abstract

Target bisulfite sequencing of GSTP1 RNF219 gene fragments in circulating DNA from the blood plasma of healthy donors, benign prostate hyperplasia and prostate cancer patients was performed. The level of single CpG site (for each target) methylation could reliably distinguish between cancer patients and other groups. This study has highlighted the significance correlation between methylation statuses of CpG-sites on the molecular level for prostate cancer diagnostic. According to the ROC curves sensitivity and specificity for GSTP1 was 92 % and 100 % and for RNF219 — 100 % and 66 %, respectively.

Background

Aberrantly methylated cell-free DNA (cfDNA) has proved to be a promising biomarker for noninvasive detection of cancer with several clinically-certified tests (Epi-pro Colon®, Epi-pro Lung®, Cologuard®). However only one test (Epi-pro Colon®) uses blood plasma — the most convenient source of cfDNA. Tissue and age specific methylation along with unidentified reasons lead to the presence of molecules with every conceivable cytosine-methylation patterns in blood circulation [Korshunova et al., 2009]. Among numerous variants of cfDNA methylation patterns only few reflect cancer related changes. To identify those tumor-specific profiles single nucleotide resolution of methylated cytosine locations in the individual circulating DNA molecules is obviously required.

Materials and methods

We performed target bisulfite sequencing of potential prostate cancer (PC) cfDNA markers (GSTP1; RNF219) isolated from blood plasma

of 18 healthy donors (HD), 17 benign hyperplasia (BPH) and 20 PC patients using MiSeq platform (Illumina). Selected loci were amplified after bisulfite conversion (Zymo Research) of cfDNA with methyl-independent barcoded primers and sequenced with coverage ranging from 23509 to 143953.

Results

To reveal diagnostically significant differences several approaches to data analysis were used. Conventional approach — prediction of patient's diagnosis based on differences in methylation level of CpG-sites. And the approach that relies on discrimination of cancer-related correlation between methylation statuses of CpG-sites within individual molecules of cfDNA — Intramolecular Correlation of Methylation Statuses (ICoMS) — was proposed in this study.

Study population was randomly subsampled into training and test cohorts. The logit regression model based on methylation level of CpG-sites achieved an area under the ROC curve (AUC) exceeding 0.94 in both cohorts for GSTP1 gene and 0.81 — for RNF219 gene.

A novel approach to identify diagnostic significance of cfDNA methylation was based on comparison of correlation matrices (pairwise phi coefficient between methylation statuses of CpG sites) for HD, BHP and PC groups. Binomial regression models with LASSO penalization were used to predict patient's diagnosis. ROC curves for fitted models show AUC, specificity and sensitivity as 0.99, 100 % and 92 % for GSTP1 gene and 0.84, 66 % and 100 % for RNF219 (test cohort).

Conclusions

The ICoMS approach evaluates diagnostic value of target genes and reveals cancer-related cytosine methylation. That could potentially identify the features of tumor physiology and on a par with conventional approaches provide helpful information for rational design of noninvasive, methylation-specific cfDNA-based diagnostics for PC.

МОРФОЛОГИЯ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЕЗИКУЛ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА *

MORFOLOGY AND PROTEOMIC ANALYSIS OF HUMAN PLACENTA VESICLES

Е. Е. Буркова, Г. А. Невинский

*ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, г. Новосибирск
Национальный исследовательский Новосибирский
государственный университет*

E. E. Burkova, G. A. Nevinsky
ICBFM SB RAS, NSU, Russia

e-mail: jorochka24@mail.ru

Аннотация

В настоящей работе выполнены исследования морфологии и протеомный характеристик везикул плаценты здоровых женщин. Препараты везикул, полученные серией центрифугирований и ультрацентрифугирований, были дополнительно очищены от совыделяющихся белков и белковых комплексов с помощью гель-фильтрации. Анализ белкового состава очищенных везикул с помощью 1D SDS-PAGE, 2D SDS-PAGE, MALDI-TOF масс-спектрометрии показал, что они содержат 10–15 различных белков.

Abstract

A morphological and a proteomic analysis of vesicles of normal pregnancy human mother placentas was performed. Vesicles

* Работа поддержана Программой ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 годы № VI 59.1.2, грантом РФФИ № 16-04-00609.

preparations obtained by several typical centrifugation and ultracentrifugation were additionally purified from multiprotein complexes and other associated proteins by gel filtration. Proteins of purified vesicles were identified by different methods including analysis of tryptic hydrolysis of proteins separated SDS-PAGE and by two-dimensional electrophoresis separation using MALDI MS and MS/MS spectrometry. The purified individual vesicles contain only 10–15 different clearly visible proteins.

В последние годы исследование везикул плаценты привлекает к себе большой интерес в связи с их важной ролью при беременности. Показано, что основной и уникальный тип клеток в плаценте — синцитиотрофобласт, на протяжении всей беременности секретирует в кровь матери различные внеклеточные везикулы, такие как экзосомы (40–100 нм) и микровезикулы (100 нм–1 мкм).

Функции этих везикул разнообразны: межклеточная коммуникация, участие в секреции белков, супрессия иммунного ответа и многое другое. Таким образом, эти компоненты плаценты имеют огромное значение для успешного протекания беременности. Однако, несмотря на многолетние исследования, состав и свойства всех везикул плаценты исследованы недостаточно полно. Кроме того, исследование плацентарных везикул имеет огромную практическую значимость — везикулы можно использовать как биологические маркеры в диагностике заболеваний во время беременности.

Целью настоящей работы было выделение везикул из плаценты здоровых женщин, очистка от совыделяющихся белков и белковых комплексов, а также анализ их морфологии и белкового состава. Везикулы из плаценты выделяли дифференциальным центрифугированием предварительно ультрафильтрованного экстракта гомогената плаценты человека. Для дополнительной очистки везикул от совыделяющихся белков и белковых комплексов проводили гель-фильтрацию ресуспендированного осадка, полученного ультрацентрифугированием при 100 000 g, на колонке с сорбентом сефароза 4В.

Трансмиссионной электронной микроскопией обнаружены везикулы размером 30–230 нм и микрочастицы в одной из трех фракций, полученных гель-фильтрацией. Иммунохимическим окрашиванием

при помощи антител к маркерным белкам CD63 и CD81 показано наличие экзосом в этой фракции. Белковый состав данной фракции проанализирован с использованием одномерного, двумерного электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Среди белков были идентифицированы как специфичные для плаценты, такие как плацентарная щелочная фосфатаза, так и другие белки, встречающиеся во многих тканях и жидкостях организма.

**ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ОБРАЗЦОВ ЭКЗОСОМ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРОВИ,
МОЧИ И СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЛЮДЕЙ МЕТОДОМ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЙ**

**ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF EXOSOMES
OBTAINED FROM HUMAN BLOOD, URINE AND TEARS
BY SEQUENTIAL CENTIFUGATIONS**

А. Е. Григорьева ¹, А. В. Еремина ², С. Н. Тамкович ¹,
О. Е. Брызгунова ¹

¹ *ФБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Новосибирский филиал МНТК
«Микрохирургия глаза» Минздрав РФ*

А. Е. Grigor'eva ¹, А. В. Eremina ², С. Н. Tamkovich ¹, О. Е. Bryzgunova ¹

¹ *Institution of chemical biology and fundamental medicine SB RAS*

² *MNTK «Eye Microsurgery»*

Аннотация

С помощью электронной микроскопии были исследованы образцы «экзосом», выделенные из плазмы крови, мочи и слезной жидкости с помощью метода последовательных центрифугирований. Все об-

разцы содержали везикулы размером 40–100 нм, которые по морфологическим признакам соответствовали экзосомам. Кроме того, во всех образцах были обнаружены компоненты, не имеющие мембраны, наибольшего внимания из которых заслуживают микрочастицы (компактные агрегаты белка), присутствие которых следует учитывать при исследовании образцов молекулярно-биологическими методами.

Abstract

Exosome samples obtained from blood plasma, urine and tears of healthy humans by sequential centrifugations were examined in electron microscope. In all samples vesicles 40–100 nm were detected, their morphological characteristics corresponded to exosomes found in other biological fluids. Components without membrane were found in all samples, most interesting was detection of the microparticles (compact protein aggregates), which can affect the results of molecular-biological investigation.

Цели и задачи

Экзосомы — группа внеклеточных везикул, исследования которых на сегодняшний день является одной из самых бурно-развивающихся областей науки. Экзосомы образуются путем «специального» процесса из мембраны эндосомы и это обуславливает их уникальные свойства: (1) молекулярный состав экзосом зависит от функционального состояния клеток-продуцентов; (2) экзосомы содержат зашифрованное в биологически активных молекулах «сообщение», которое может влиять на функционирование клеток-реципиентов. Предполагается, что экзосомы являются ценным источником молекулярных маркеров различных заболеваний и могут быть использованы в качестве терапевтических агентов. Активные исследования экзосом ведутся более 15 лет, тем не менее, остаются нерешенными многие вопросы, связанные с образованием экзосом, механизмами включения целевых молекул, и путями проникновения экзосом в клетки-реципиенты. Успешное развитие исследований экзосом предполагает наличие эффективных способов получения «чистых» образцов экзосом из биологических жидкостей. Несмотря на то, что разработка более совер-

шенных методов выделения экзосом ведется постоянно, наиболее эффективным, распространенным и доступным методом на сегодняшний день остается метод последовательных центрифугирований, который применяют для выделения экзосом из культуральной жидкости, крови, мочи, слюны и других жидкостей. Полученные методом последовательных центрифугирований образцы многие авторы называют «экзосомы», несмотря на то, что они содержат и структуры, не имеющие мембраны. Наличие в препаратах «не-экзосомальных» структур необходимо принимать во внимание для корректной интерпретации в полученных экспериментах данных. Электронная микроскопия позволяет прямо визуализировать все компоненты образцов и контролировать наличие различных примесей. Целью данной работы было провести электронно-микроскопическое исследование компонентов образцов, полученных из крови, мочи и слезной жидкости людей с помощью метода последовательных центрифугирований.

Материалы и методы

Образцы слезной жидкости здоровых людей были получены из МНТК «Микрохирургия глаза». Образцы плазмы крови здоровых людей были получены из центральной клинической больницы СО РАН, а образцы мочи здоровых людей — из Новосибирского НИИ патологии кровообращения им. акад. Мешалкина Е. Н.

Метод последовательных центрифугирований включает низкоскоростное центрифугирование для осаждения клеточного детрита, фильтрацию через фильтр с размером пор 100 нм для удаления частиц крупнее 100 нм и двукратное ультрацентрифугирование для осаждения экзосом. Полученные на конечной стадии очистки образцы в дальнейшем именуется «экзосомы». Для того, чтобы доказать природу экзосом, в образцах иммуноцитохимически выявляли рецепторы CD63, CD9 и CD24 с помощью моноклональных антител. Образцы «экзосом», приготовленные методом негативного контрастирования, изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Japan) с цифровой фотокамерой Veleta (SIS, Germany).

Результаты и обсуждение

В электронном микроскопе были визуализированы компоненты образцов «экзосом», полученных из крови, мочи и слезной жидкости с помощью метода последовательных центрифугирований с различными модификациями. Все исследованные образцы содержали везикулы и компоненты, не имеющие мембраны. Везикулы в образцах имели округлую или чашеобразную форму, низкую или среднюю электронную плотность и размер 40–100 нм, таким образом, по морфологическим признакам, их можно отнести к экзосомам (см. рис.). Природа экзосом была подтверждена с помощью иммуноцитохимического метода: во всех образцах наблюдались везикулы, демонстрирующие положительную реакцию с антителами к белкам CD63, CD9 и CD24, которые являются специфическими маркерами экзосом.

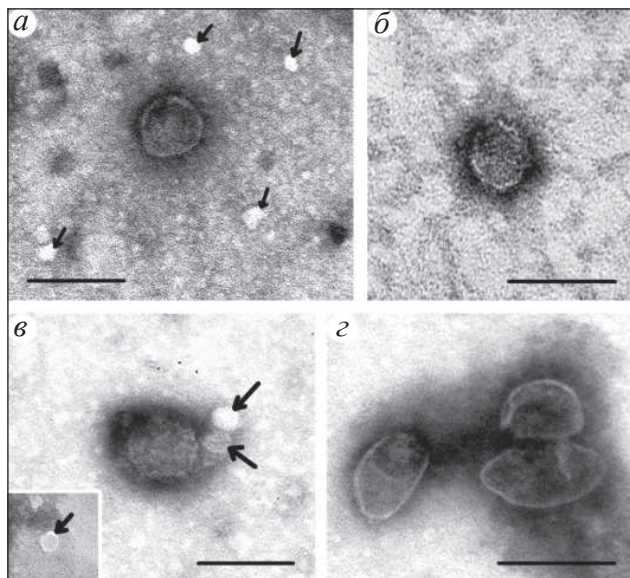
В образцах «экзосом», выделенных из плазмы крови, помимо экзосом, содержались микрочастицы — компактные агрегаты белка с четкой границей, располагающиеся обычно по одиночке, размером 20–40 нм (см. рис., *a*), и белки плазмы, представляющие собой рыхлые скопления округлых частиц размером около 10 нм.

В образцах «экзосом», выделенных из мочи, помимо экзосом, обнаружены частицы детрита в виде бесформенных агрегатов, червеобразные структуры и микрочастицы (рис., *г*). Стоит отметить, что не все везикулы в образцах «экзосом» мочи имели округлую форму, мембрана некоторых из них была деформирована, из-за чего везикулы приобретали «хвостатый» вид.

В образцах «экзосом», выделенных из слезной жидкости, помимо экзосом, наблюдались частицы детрита и микрочастицы (рис., *б–в*).

Таким образом, электронно-микроскопическое исследование установило присутствие микрочастиц во всех исследованных образцах, независимо от типа биологической жидкости. Следует подчеркнуть, что количество микрочастиц во всех препаратах значительно и сопоставимо с количеством экзосом. В некоторых опубликованных исследованиях сообщается о присутствии в препаратах экзосом микрочастиц, однако, авторы не учитывают этот фактор при анализе результатов, и все наблюдаемые эффекты относят на счет экзосом.

Выделить чистые экзосомы можно, используя сорбцию на магнитных шариках, несущих специфические антитела с последующим отделением экзосом от носителей, однако, пригодность полученных препаратов для дальнейших исследований не очевидна. Данный метод также требует специального оборудования и соответствующего финансирования.



Компоненты образцов «экзосом», выделенные методом последовательных центрифугирований из: *а* — плазмы крови, *б–в* — слезной жидкости, *г* — мочи. Стрелками показаны микрочастицы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование

Происхождение и химический состав микрочастиц остаются неясными и требуют дальнейшего исследования. Несомненно, наличие микрочастиц оказывает влияние на результаты молекулярно-биологических исследований, поэтому необходимо контролировать чистоту образцов с помощью электронной микроскопии и учитывать наличие примесей в образцах при анализе данных, полученных методами молекулярной биологии.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МОНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

GENES OF MONORESISTANCE EXPRESSION DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY FOR NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

И. В. Дерюшева ^{1,3}, М. М. Цыганов ^{1,2}, Е. О. Родионов ¹,
М. К. Ибрагимова ^{1,2}, С. В. Миллер ¹, Н. В. Литвяков ^{1,2}

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национально исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»*

² *Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный
исследовательский Томский государственный университет»*

³ *Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Сибирский государ-
ственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации*

I. V. Deryusheva ^{1,3}, M. M. Tsyganov ^{1,2}, E. O. Rodionov ¹,
M. K. Ibragimova ^{1,2}, S. V. Miller ¹, N. V. Litvyakov ^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk NRC

² Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine,
Tomsk State University

³ Siberian State Medical University

Аннотация

По данным ряда авторов использование химиотерапии в неоадьювантном режиме (НХТ) при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) представляется перспективным. При этом многие из них указывают на то, что на эффективность НХТ влияют основные клинико-морфо-

логические параметры; генетические особенности и различные физиологические особенности организма, а также молекулярно-генетические особенности опухоли, связанные с изменениями в онкогенах, генах-супрессорах и в паттерне экспрессии многочисленных генов метаболических путей, транспортных генов, генов ферментных систем и т. п. [Hansen H. H., 2008; Olaussen K. A. et al., 2006]. Одним из важных препятствий конвенциональной химиотерапии рака легкого является персонализация химиотерапии для каждого конкретного пациента. Известно, что ответ опухоли на отдельные препараты коррелирует с уровнем экспрессии генов химиочувствительности (ХЧ), таких как: *RRM1*, *ERCC1*, *Top1*, *Top2α*, *TYMS* и *TUBB3* [Цыганов и др., 2015]. Таким образом целью настоящей работы явилось исследование экспрессии генов химиочувствительности в процессе неoadъювантной химиотерапии у больных немелкоклеточным раком легкого.

Abstract

According to some authors, the use of chemotherapy in the neoadjuvant mode (NAC) for non-small cell lung cancer (NSCLC) is promising. However, many of them indicate that the influence on the efficiency NHT major clinical and morphological parameters; genetic features and a variety of physiological characteristics of the organism, as well as molecular genetic characteristics of the tumor, associated with changes in oncogenes, suppressor genes and expression patterns of many metabolic pathways of genes, transport genes, gene enzyme systems, etc. [12]. One of the major obstacles to conventional chemotherapy of lung cancer is chemotherapy personalization for each individual patient. It is known that tumor response to drugs specific gene expression correlates with the level of chemosensitivity (chemically pure), such as *RRM1*, *ERCC1*, *Top1*, *Top2α*, *TYMS* and *TUBB3* [Tsyganov M. M. et al., 2015]. Thus, the aim of this work was to study gene expression chemosensitivity in the neoadjuvant chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer.

Материалы и методы

Всего в работе было проанализированы результаты лечения 24 пациентов. В исследование включены больные НМРЛ I-IIIА стадии,

центральной или периферической локализации с морфологически верифицированным диагнозом. Больные находились на лечении в клинике Томского НИМЦ, которые в неoadьювантном режиме получали 2 курса химиотерапии по схеме винорелбин-карбоплатин. После НХТ пациентам проводилась операция в объеме пневмонэктомии или лобэктомии. Далее адьювантная химиотерапия (АХТ). В качестве исследуемого материала были использованы биопсийные опухолевые образцы нормальной и опухолевой ткани легкого до лечения и после НХТ. РНК выделяли из 24 парных образцов с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени относительно нормальной ткани легких [Litviakov N. V. et al., 2013]. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0». Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Для анализа безметастатической и общей выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера [Kaplan E. L. and Meier P., 1958].

Результаты. На первом этапе проведенного исследования было установлено, что экспрессия генов ХЧ слабо коррелирует с клинико-морфологическими параметрами заболевания. Статистически достоверная связь была показана для гена репарации *ERCC1*. В группе пациентов T_{1-2} начальный уровень экспрессии гена выше по сравнению с T_{3-4} ($p = 0,04$). Показано, что высокая экспрессия гена *ERCC1* определяет устойчивость опухоли легкого к препаратам платины и это может объяснять высокую эффективность применения схем с платиной по отношению к пациентам размером опухоли T_{3-4} . С эффектом НХТ сопряжен только послеоперационный уровень экспрессии гена *RRM1* ($0,3457 \pm 0,073$ и $0,8922 \pm 0,247$, при стабилизации и частичной регрессии соответственно, $p = 0,03555$). Далее мы изучили связь НХТ с определенным начальным уровнем исследуемых генов монорезистентности. Оказалось, что в 13 из 15 случаев (87 %) больных, у которых уровень экспрессии гена *RRM1* меньше 1 наблюдается стабилизация опухолевого процесса, тогда как в 4 из 6 случаев (67 %)

пациентов с уровнем более 1, наблюдается хороший ответ на проводимое лечение (рис. 1).

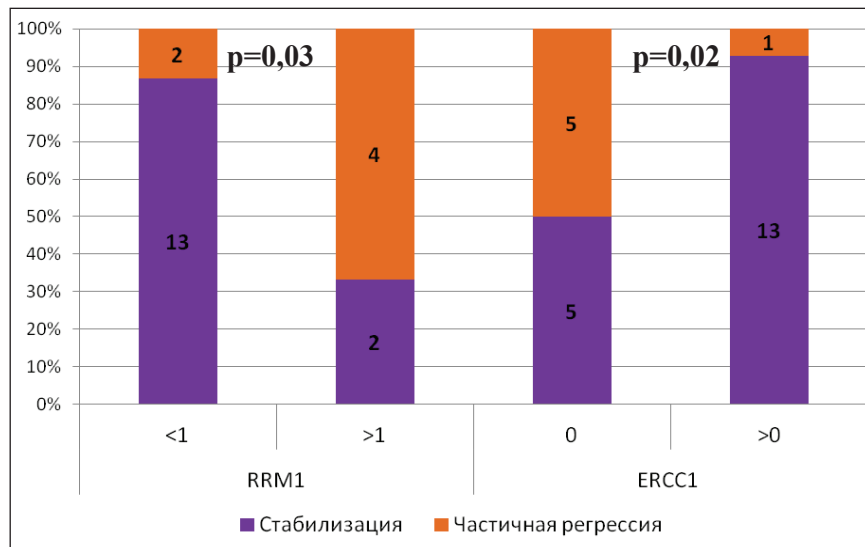


Рис. 1. Связь начального уровня экспрессии генов химиочувствительности *RRM1* и *ERCC1* с эффектом неoadъювантной химиотерапии

Интересные данные были получены для гена *ERCC1*, определяющего чувствительность опухоли к препаратам платины и в частности, карбоплатину. Было установлено, что в 93 % случаев у пациентов с наличием экспрессии данного гена наблюдается плохой ответ на НХТ. Что может быть обусловлено высоким уровнем репарации ДНК и как следствие низкой эффективностью препарата.

При этом оценка прогностической значимости изменения экспрессии генов химиочувствительности показала, что увеличение экспрессии генов *TUBB3* и *ERCC1* сопряжено с безрецидивной выживаемостью (для гена *ERCC1* на уровне выраженной тенденции) (рис. 2, А и Б для гена *TUBB3* и *ERCC1* соответственно) больных НМРЛ. Уменьшение экспрессии данных генов в процессе лечения ассоции-

ировано с более высокими показателями выживаемости по сравнению с группой пациентов с повышением экспрессии (log-rank test = 0,04 и 0,08, соответственно для гена *TUBB3* и *ERCC1*).

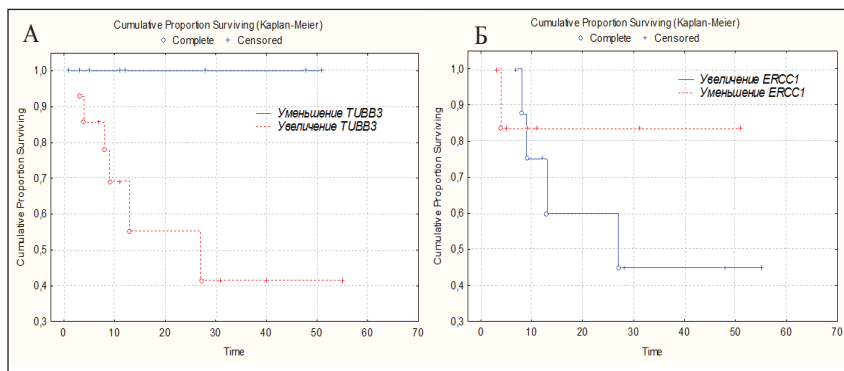


Рис. 2. Безрецидивная выживаемость больных НМРЛ в зависимости изменения экспрессии генов *TUBB3* (А) и *ERCC1* (Б)

Выводы. В результате исследования была изучена экспрессия генов химиочувствительности в процессе НХТ у больных немелкоклеточным раком легкого. Было установлено, что экспрессия данных генов слабо коррелирует с клинико-морфологическими параметрами. Эффект НХТ сопряжен с определенным уровнем экспрессии генов *RRM1* и *ERCC1*. Оценка прогностической значимости изменения экспрессии генов показала, что с более высокими показателями безрецидивной выживаемости коррелирует уменьшение экспрессии *TUBB3* и *ERCC1* в процессе лечения.

**ИНГИБИТОРЫ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ
ЯВЛЯЮТСЯ СЛАБЫМИ АКТИВАТОРАМИ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА FMR1 В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ
С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ ***

**INHIBITORS OF HISTONE DEACETYLASES
ARE WEAK ACTIVATORS OF FMR1 GENE
IN FRAGILE X SYNDROME CELL LINES**

А. А. Дольский ¹, В. О. Пустыльняк ³,
А. А. Ярушкин ³, Н. А. Лемская ², Д. В. Юдкин ²

¹ *Новосибирский государственный университет*

² *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН*

³ *Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН*

A.A. Dolzkiy ¹, V. O. Pustyl'nyak ³, A.A. Yarushkin ³,
N.A. Lemskaya ², D. V. Yudkin ²

¹ Novosibirsk State University, Russia

² The Institute of Molecular Biology and Biophysics, Russia

³ Institute of molecular and cellular biology SB RAS, Russia

Аннотация

Данная работа посвящена исследованию способности ромидеписина и вориностата (ингибиторов деацетилаз гистонов) реактивировать ген FMR1 в культурах клеток В-лимфоцитов пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

* The work was supported by the Russian Science Foundation project 15-15-10001 for cell culture work and by FASO Russia on the project 0310-2014-0003 for gene expression assay.

Abstract

This work is devoted to research the ability of romidepsin and vorinostat (histone deacetylase inhibitors) to reactivate the *FMR1* gene in B-lymphocytes cell lines of patients with fragile X syndrome.

Fragile X syndrome is the most common cause of inherited mental retardation disease. The syndrome is characterized by the lack of FMRP protein involved in neuronal development. The absence of this protein is associated with inhibition of *FMR1* expression which caused by expansion of trinucleotide repeat CGG (over then 200 units) in the 5'UTR of *FMR1* gene, methylation of CpG islands in promoter region and a N-deacetylation of H3 and H4 histones. Currently, there are no methods for the syndrome treatment, but some drugs such as folic acid, minocycline, and valproic acid are used to insignificantly increase attentiveness and learning ability, and to lower patient's hyperactivity. However, these substances do not restore function of *FMR1* gene. Therefore, an urgent task is the development of methods for Fragile X syndrome treatment. Currently, several laboratories are developing methods of restoring *FMR1* gene expression. It was shown that 5-azadeoxycytidine (inhibitor of DNA methyltransferase), 4-phenylbutirate (inhibitor of histone deacetylase) are reactivating *FMR1* gene expression. Nevertheless, these chemicals cannot be used in clinical practice because of their high cytotoxicity. At the same time, inhibitors of histone deacetylase such as romidepsin and vorinostat are approved by US Food and Drug Administration for the treatment of cancer in clinical practice. In this regard, a special interest is a study of these drugs on the ability to restore the expression of the *FMR1* gene.

Results

Romidepsin not reactivate FMR1 gene. Effect of vorinostat is insignificant and comparable to the effect a known reactivator — trichostatin A.

Activating of FMR1 gene by vorinostat and absence of activation after romidepsin treatment indirectly points that class II of HDACs but not class I plays role in FMR1 promoter heterochromatinization in FXS patients cell line GM04025.

Cell line CPG7 shown differences with cell line GM04025 in response to treatment with activators. It leads us to thought that mechanism of

FMR1 gene inactivation is more complicated than thought before; at least it can be different in different patient's cell lines.

Obtained data indicate that acetylation and deacetylation of histones is not a key factor of FMR1 regulation of gene expression, whereas a change in methylation of CpG island in promoter region has a significant effect on FMR1 gene expression.

ВЛИЯНИЕ ГЛИКИРОВАНИЯ МЕТИЛГЛИОКСАЛЕМ НА СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА УБИКВИТИН-КОНЬЮГИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА UBE2N

EFFECTS OF GLYCATION BY METHYLGLYOXAL ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME UBE2N

И. Ю. Жуков ^{1,2}, Е. Л. Гурьев ², А. Т. Копылов ³, Ю. В. Мезенцев ³,
А. Л. Чернорудский ², В. Г. Згода ³, А. С. Иванов ³, М. Р. Гайнуллин ^{1,2}

¹ *Нижегородский Государственный Университет
им. Н. И. Лобачевского*

² *ГБОУ ВПО Нижегородская Государственная
Медицинская Академия Минздрава России*

³ *Научно-исследовательский институт биомедицинской
химии имени В. Н. Ореховича*

I. Yu. Zhukov ^{1,2}, E. L. Guryev ², A. T. Kopilov ³, Yu. V. Mezentssev ³,
A. L. Chernorudskiy ², V. G. Zgoda ³, A. S. Ivanov ³, M. R. Gainullin ^{1,2}

¹ Nizhniy Novgorod State University, Russia

² Nizhniy Novgorod State Medical Academy, Russia

³ Orekhovich IBMC

e-mail: ilya_zhukov52@mail.ru

Аннотация

Убиквитин-конъюгирующий фермент UBE2N в составе гетеродимерного комплекса с адаптерным белком UEV1 катализирует

формирование мультиубиквитиновых цепей, полимеризованных по остаткам лизина-63, выполняющих регуляторную функцию. В данной работе изучена неферментативная модификация убиквитин-конъюгирующего фермента UBE2N метилглиоксалем (МГ), являющимся эндогенным метаболитом с выраженной гликирующей способностью. Полученные в ходе работы результаты указывают, что воздействие неферментативного гликирования на белок-белковые взаимодействия является ведущим механизмом нарушений UBE2N-опосредованного убиквителирования.

Abstract

The ubiquitin-conjugating enzyme UBE2N as part of the heterodimer complex with the adapter protein UEV1 catalyzes the formation of multi-ubiquitin chains, polymerized by lysine-63 residues, performing a regulatory function. In this study, we investigated the non-enzymatic modification of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2N by methylglyoxal (MG). MG is an endogenous metabolite with high glycation ability. The results obtained in the course indicate the effect of non-enzymatic glycation on protein-protein interactions is the leading mechanism of violations UBE2N-mediated ubiquitylation.

Убиквителирование — многоступенчатый процесс, который катализируется организованной мультиферментной системой, состоящей из убиквитин-активирующего фермента E1, убиквитин-конъюгирующего фермента E2 и убиквитин-протеин лигазы E3, катализирующие присоединение молекулы убиквитина к субстрату. Белок UBE2N — представитель класса убиквитин-конъюгирующих ферментов E2. Его характерной особенностью является способность специфически гетеродимеризоваться с адаптерным белком UEV1 (ubiquitin conjugating enzyme variant 1, UBE2V1). Комплекс UBE2N-UEV1 катализирует формирование мультиубиквитиновых цепей, полимеризованных по внутренним остаткам лизина-63 в молекуле убиквитина (Hofmann, Pickart, 2001). Данный тип мультиубиквитиновых цепей играет ключевую роль в регуляции большого числа путей клеточной сигнализации.

Метилглиоксаль (МГ) — эндогенный метаболит, побочный продукт анаэробного гликолиза и ряда других процессов (Rabbani, Thornalley, 2014). МГ относится к числу наиболее активных гликирующих агентов и легко взаимодействует с белками с образованием специфических аддуктов аминокислот: карбоксиэтил-лизина (Carboxyethyl-lysine) в реакции с остатками лизина и гидроимидазолонов (N δ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithin, MG-H1 и Dihydroxyimidazolidine) и аргпиримидина в реакции с остатками аргинина. МГ рассматривается как ведущий фактор в развитии таких патологий, как сахарный диабет и хроническая почечная недостаточность

В подавляющем большинстве работ заключение о функциональной роли гликирования делается лишь на основании самого факта модификации, без дополнительного функционального анализа. В этой связи представляется исключительно важным исследование молекулярного механизма МГ-индуцированных нарушений свойств белков. Настоящее исследование ставило своей целью выявить молекулярный механизм влияния МГ на способность UBE2N синтезировать свободные мультиубиквитиновые цепи, аутоубиквитилироваться и формировать гетеродимер с белком UEV1.

В ходе работы была реконструирована убиквитилирующая система *in vitro*, проведена инкубация UBE2N с МГ. Полученные таким способом пробы исследовались при помощи электрофореза белков в полиакриламидном геле и иммуно-блоттинга. Также был применен масс-спектрометрический анализ и иммобилизация лиганда на поверхности оптического чипа CM5 и исследование белок-белковых взаимодействий методом поверхностного плазмонного резонанса.

Для проведения экспериментов *in vitro* была выбрана убиквитин-конъюгирующая ферментативная система, состоящая из белков UBE2N (Ubc13) и UEV1. UBE2N в комплексе с адаптерным белком UEV1 катализирует реакцию синтеза мультиубиквитиновых цепей, что четко наблюдалось на иммуноблоттинге с антиUBE2N и антиубиквитиновыми антителами. Концентрация МГ, взятая для инкубации с UBE2N составила 5mM. Иммуноблоттинг с антиUBE2N антителами показал, что происходит накопление высокомолекуляр-

ных агрегатов белка UBE2N в дополнение к мономерной и димерной формам, характерным для интактного препарата. По-видимому, это результат образования МГ-опосредованных поперечных сшивок. В литературе описаны примеры МГ-индуцированной димеризации белков: метилглиоксаль-лизиновые димеры (MOLD, methylglyoxal lysine dimer) и образование ковалентной связи между остатками лизина и аргинина (MODIC, methylglyoxal derived imidazolone crosslink) (Ahmed, Thornalley, 2007).

Инкубация с МГ в концентрации 5 мМ в различной степени влияет на оба типа UBE2N-опосредованной активности. Иммуноблоттинг с антиUBE2N и анти-убиквитиновыми антителами показал, что реакция синтеза мульти-убиквитиновых цепей, катализируемая гетеродимером UBE2N- UEV1, полностью подавляется. При этом, в тех же условиях не происходит изменения автокаталитической активности фермента. Эти результаты позволили нам предположить, что важной мишенью ингибирующего действия МГ на активность UBE2N являются специфические белок-белковые взаимодействия с адаптерным белком UEV1. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты по изучению процесса образования гетеродимерного комплекса UBE2N-UEV1 методом поверхностного плазмонного резонанса. Установлено, что инкубация с МГ в концентрации 5 мМ вызывает снижение аффинности субъединиц гетеродимера UBE2N-UEV1 в 2 раза.

Для выяснения природы данного эффекта нами проведено масс-спектрометрическое (ЖХ-МС/МС) картирование белка UBE2N, модифицированного МГ. Покрытие аминокислотной последовательности в ЖХ-МС/МС эксперименте составило 72 % (т. е. 114 аминокислот из 157, недоступны для анализа по 2 остатка лизина и аргинина). Инкубация с 5 мМ МГ вызывает образование гидроимидозолоновых аддуктов (MG-H1) остатков аргинина R14, R33, R70, R85, R141, R145 и карбоксиэтил-лизиновых дериватов K24, K53, K68.

По данным базы данных 3D структур PDB (pdb id 2c2v), часть аминокислотных остатков, содержащих МГ-модифицированные боковые цепи, локализованы в области специфических белок-белковых контактов между UBE2N и UEV1. Более того, остатки R70 и R85 принимают участие в образовании водородных связей,

а остатки R85 и K74 — в электростатических взаимодействиях (salt bridges), стабилизирующих гетеродимер.

Таким образом, МГ в концентрации 5мМ оказывает существенное влияние на структуру и функции белка UBE2N. Структурные изменения включают специфическую МГ-зависимую модификацию полипептидной цепи. На уровне мономеров фермента это выражается в образовании аддуктов аргинина и лизина — гидроимидазолонна и карбоксиэтил-лизина, соответственно. Кроме того показано, что под действием МГ происходит формирование высокомолекулярных белковых агрегатов. Можно предположить, что «поперечные сшивки» между отдельным полипептидами UBE2N являются результатом образования метилглиоксаль-лизиновых димеров (MOLD, methylglyoxal lysine dimer) и/или ковалентной связи между остатками лизина и аргинина (MODIC, methylglyoxal derived imidazolone crosslink). Следствием структурной модификации белка являются функциональные нарушения UBE2N-опосредованного катализа, выражающиеся в подавлении синтеза мультиубиквитиновых цепей, катализируемого гетеродимером UBE2N-UEV1. При этом автокаталитическая активность UBE2N при этом полностью сохраняется. Следовательно, результатом МГ-индуцированной модификации белка UBE2N является блокирование его специфического взаимодействия с адаптерным белком UEV1.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что нарушение белок-белковых взаимодействий является первичной (ранней) стадией модифицирующего действия метилглиоксаля. Эти нарушения могут предшествовать иным, описанным в литературе, МГ-опосредованным механизмам модификации свойств белков.

Литература

1. Hofmann R. M., Pickart C. M. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. № 30. P. 27936–43.
2. Ahmed N., Thornalley P. J. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? // Diabetes Obes. Metab. 2007. Vol. 9. P. 233–245.

3. Rabbani N., Thornalley P.J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples // Nat protoc. 2014. Vol. 9, № 8. P. 1969–1979.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ
НА ОСНОВЕ M2E ПЕПТИДА ВИРУСА ГРИППА,
ОБРАЗУЮЩИХ НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ**

**CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS BASED
ON THE M2E PEPTIDE OF INFLUENZA VIRUS ABLE
TO SELF-ASSEMBLE INTO NANOSIZED PARTICLES**

А. А. Зыкова, В. В. Куприянов

ФИЦ Биотехнологии РАН, ФГБУН Центр «Биоинженерия»

A.A. Zyкова, V.V. Kuprianov
Centre «Bioengineering» RAS, Russia

e-mail: Nuta2109@gmail.com

Аннотация

Наиболее эффективным способом предотвращения распространения гриппа является вакцинация. Основными антигенными белками вируса гриппа являются гемагглютинин и нейраминидаза, однако их высокая изменчивость не позволяет на их основе создавать эффективные вакцины сразу против нескольких вирусных штаммов. Использование внеклеточного домена M2 белка (M2e), высоко консервативного у большинства штаммов вируса гриппа, как человека, так и животных, позволяет создать «универсальную» рекомбинантную вакцину.

Abstract

Vaccination is the most effective way to prevent from the spread of the flu. Hemagglutinin and neuraminidase are the major antigenic proteins of the influenza virus. However, because of their high variability it's impossible to create effective vaccines against several viral strains. The use of the extracellular domain of M2 protein (M2e) gives an opportunity to create a universal recombinant vaccine. The linkers are important to use while constructing chimeric molecules in order to give them desired properties. The purpose of our work is the study of the effect of peptide helical linker on the ability to form nanosized particles during the construction of the recombinant proteins based on the M2e peptide of influenza virus.

Использование внеклеточного домена M2 белка (M2e), высоко консервативного у большинства штаммов вируса гриппа, как человека, так и животных, дает возможность для создания «универсальной» гриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка. Линкеры являются важными компонентами при конструировании химерных молекул, позволяющие придать им желаемые свойства. Спиральные линкеры могут играть роль жесткого негибкого разделителя доменов белков, способствуя их независимому фолдингу, и могут уменьшать нежелательные взаимодействия между ними.

Целью нашей работы было изучение влияния пептидных спиральных линкеров на способность образовывать наноразмерные частицы при конструировании рекомбинантных белков на основе M2e пептида вируса гриппа человека.

Все манипуляции с ДНК — клонирование последовательностей в плазмидные векторы, рестрикция, лигирование, секвенирование, и т. п., а также трансформацию клеток *E. coli* проводили согласно общепринятым методикам. Для экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli* использовали векторы pQE30 и pQE60 (Qiagen). Очистку белков проводили на Ni-NTA-силикагеле (Promega). Полученные препараты анализировали методами электрофореза в нативных и денатурирующих условиях и с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии.

Были сконструированы гены, кодирующие рекомбинантные белки, которые содержали информацию о синтезе четырех и восьми повторов последовательностей M2e пептида «человеческого» вируса гриппа А в сочетании со спираль-образующими линкерами и гистидиновой последовательностью на N-конце, соединенной с остальной последовательностью через глициновый линкер, что облегчало связывание с никелевым сорбентом при очистке. Эти гибридные белки были экспрессированы в клетках *E.coli*. и выявлялись в растворимой фракции после лизиса клеток с помощью обработки лизоцимом, замораживания-оттаивания и ультразвуком последовательно. Наличие 6-ти гистидинов и гибкого глицинового линкера на N –конце позволило быстро очистить рекомбинантные белки из клеточного лизата, используя металл-аффинную хроматографию. Оказалось также, что наличие спиральных линкеров с обеих сторон от M2e повторов обеспечивало устойчивость белка к протеолизу. Полученные рекомбинантные белки были способны образовывать частицы в зависимости от наличия спиральных линкеров на N- и C- концах молекулы. Использование атомно-силовой микроскопии показало, что размер частиц коррелирует с наличием спирального линкера на одном или обоих концах молекулы рекомбинантного белка и от количества повторов M2e пептида. С помощью электронной микроскопии были определены размеры частиц, образуемые рекомбинантными белками. Частицы, содержащие 4 повтора M2e и спиральный линкер, выглядели рыхлыми и размер варьировал от 40 до 100нм. Частицы, содержащие 8 повторов M2e и спиральный линкер, не выявлялись. Белки с двумя спиральными линкерами были способны образовывать более крупные частицы (100–140нм), чем белки с одним (40–100 нм). Таким образом, оба компонента — спиральные линкеры и число последовательностей M2e — влияют на характер образующихся агрегатов.

Было замечено, что присутствие спиральных линкеров на N- и на C-концах молекулы способствует их агрегации и образованию наночастиц, что существенно для повышения иммуногенности вакцинного препарата. Из ряда работ известно, что наличие α -спиралей

в структуре некоторых белков обеспечивает межбелковые взаимодействия и тем самым олигомеризацию этих белков. Известно, что увеличение числа копий M2e пептида на N-конце НВс значительно усиливает иммунный ответ. Поэтому задачей работы было получение рекомбинантных белков, содержащих множественные вставки M2e пептида (4 или 8 копии) и сравнение их способности образовывать наночастицы. Отметим, что новизна работы состоит в том, что была показана возможность образования белковых агрегатов в виде наночастиц в диапазоне 100–200 нм рекомбинантными белками с четырьмя и восемью повторами «консенсусного человеческого» M2e пептида гриппа и спиральными линкерами. Полученные результаты предполагают, что выявленные наночастицы на основе рекомбинантных белков, состоящих из повторов M2eh пептида вируса гриппа и спиральных линкеров, могут быть использованы как возможная вакцина против вируса гриппа и дают основание для проведения дальнейших исследований.

КЛОНАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ГЕМАТОГЕННОЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ *

CLONAL EVOLUTION OF BREAST CANCER DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY AND HEMATOGENOUS METASTASIS

М. К. Ибрагимова ^{1,2}, М. М. Цыганов ^{1,2}, П. В. Казанцева ¹,
Р. Ю. Вернадский ¹, Е. М. Слонимская ¹,
Н. В. Чердынцева ^{1,2}, Н. В. Литвяков ^{1,2}

¹ Томский НИМЦ, Россия, г. Томск

² НИИ Томский государственный университет, Россия, г. Томск

M. K. Ibragimova ^{1,2}, M. M. Tsyganov ^{1,2}, P. V. Kazantseva ¹, R. U. Vernadski ¹,
E. M. Slonimskaya ¹, N. V. Cherdyntseva ^{1,2}, N. V. Litviakov ^{1,2}
¹ Cancer Research Institute, Tomsk NRMС, Russia, Tomsk,
² Tomsk State University, Russia, Tomsk

Аннотация

Канцерогенез и опухолевая прогрессия являются результатами клональной эволюции опухоли — процесса при котором определенные популяции клеток получают конкурентное преимущество за счет приобретения новых генетических нарушений, что приводит к их обособлению в дочерние субклоны. В свою очередь, химиопрепараты, воздействуя на опухолевые клетки, могут выступать фактором эволюции и приводить к возникновению новых генетических нарушений, поскольку они, как известно, обладают мутагенным действием, и, как следствие, новых опухолевых клонов. В настоящей работе клональная эволюция опухоли молочной железы при проведении

* Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-03091А и выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности НИ ТГУ.

неoadъювантной химиотерапии исследована при использовании платформы высокой плотности «CytoScan HD Array» (Affymetrix, USA). В результате проведения данного исследования впервые была установлена связь образования у больных новых мутантных клонов в процессе предоперационной химиотерапии РМЖ с возникновением гематогенного метастазирования. Было также показано, что обнаружение новых амплификационных клонов при проведении предоперационной химиотерапии является неблагоприятным прогностическим фактором при раке молочной железы.

Abstract

Carcinogenesis, malignancy and tumor progression are results of clonal evolution — process in which certain cell population gains competitive advantage on the basis of their new genetic configuration, resulting in their segregation into new daughterly clones. Chemotherapeutic drugs used during cancer treatment maybe responsible for introduction of additional clonal diversity, as they are known to possess mutagenic effect, which may end up in new advantageous genetic changes, resulting in an increase in the number of cancer clones. This research is aimed at studying clonal evolution of breast cancer. High density microarray «CytoScan HD Array» (Affymetrix, USA) was used to survey clonal evolution of mutant cancer clones. This study shows first obtained evidence that conduction of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer metastasis is associated with appearance of new clones. It was also shown, that detection of new amplification clones during preoperative chemotherapy is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases.

Актуальность

Предполагается, что движущим фактором клональной эволюции опухолевых клеток является образование драйверных мутаций. Это подтверждают результаты секвенирования геномов 21 опухоли молочной железы, при котором была составлена их генеалогия. Оказалось, что драйверные мутации являются иницилирующими в образовании опухоли и предшествуют развитию геномной нестабильности,

а значительная часть времени развития рака молочной железы (РМЖ) связана с генерацией внутриопухолевого разнообразия [1]. В результате опухолевые клоны (ОК) могут характеризоваться точковыми мутациями, структурными хромосомными и числовыми aberrациями, присутствием анеуплоидных клеточных популяций, образованных в процессе клональной эволюции [2]. Субклональные и новообразованные мутации развиваются постепенно в течение длительного времени, создавая обширное клональное разнообразие [3]. Дополнительные изменения в клональное разнообразие могут быть внесены при использовании химиотерапевтических средств. Обладая мутагенным эффектом и воздействуя на опухолевые клетки, химиопрепараты могут приводить к возникновению генетических нарушений и, как следствие, новых ОК [4, 5].

Целью данного исследования являлось изучение клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии (НХТ).

Материал и методы

Материалом для исследования служили 30 парных образцов биопсийного материала до лечения и операционного материала после проведения НХТ для каждого из пациентов. Была выделена ДНК из исследуемого материала при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany # 51304). Для изучения клональной эволюции мутантных ОК использовали микроматрицу CytoScan HD Array (Affymetrix, USA), позволяющую оценивать одновременно весь спектр хромосомных нарушений в ОК и проводить количественный анализ представленности мутации на фоне нормальной ДНК стромы. Для анализа изменения ОК в процессе НХТ проводили сравнение CNV (Copy Number Variation) (амплификаций делеций) у каждого больного до лечения и после НХТ и анализировали число мутантных клонов в каждой опухоли и их изменение в процессе НХТ.

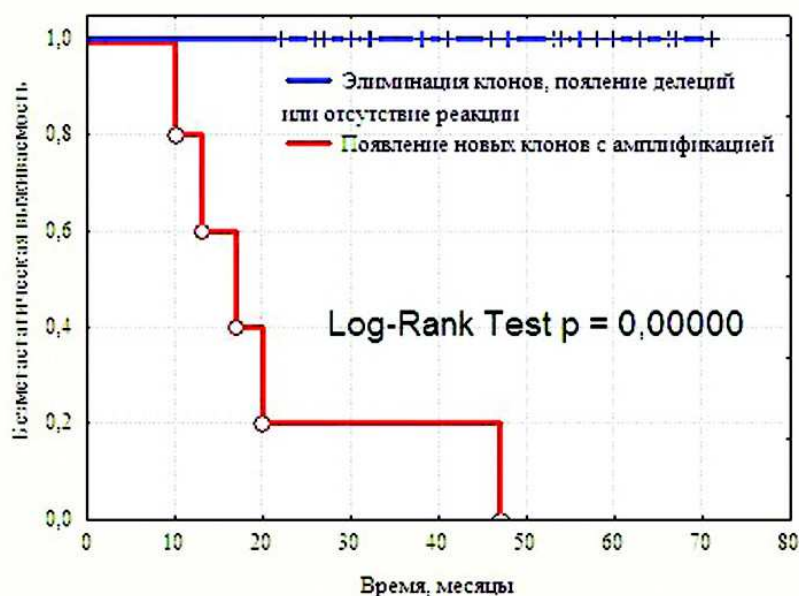
Результаты

Установлено, что изменение частоты CNV и числа мутантных клонов напрямую коррелируют с изменением объема опухолево-

го узла в ответ на химиотерапию (ХТ) (с эффективностью НХТ) по данным УЗИ и маммографии (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,64-0,82$, $p < 0,05$). Объем опухоли является важным показателем, который определяет возможность проведения органосохранной операции, но слабо связан с прогнозом заболевания [6]. По нашему мнению, изменение частоты CNV и числа мутантных клонов может использоваться в качестве дополнительного критерия для оценки эффективности НХТ, которая отражает истинное влияние ХТ на опухоль. В процессе НХТ под влиянием химиопрепаратов происходит клональная эволюция опухоли, при которой происходит изменение опухолевых клонов — полное/частичное исчезновение или появление новых клонов.

Установлено, что в процессе НХТ у 43 % (13/30) больных уменьшалось количество мутантных клонов (вплоть до полной элиминации: 4 случая полной генетической регрессии опухоли), в 27 % (8/30) случаев химиотерапия не оказывала никакого влияния на количество мутантных опухолевых клонов и частоту хромосомных аномалий. У 30 % (9/30) больных наблюдались случаи появления в процессе НХТ новых мутантных клонов. При этом, у 6 пациентов под действием НХТ происходит образование новых опухолевых клонов, несущих амплификации. Установлено, что новые клоны, образованные под действием НХТ, содержат амплификации в следующих локусах: **5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 19p, 18chr**. Анализ генного состава показал, что в каждом из этих локусов находятся гены системы адгезии (# *CDH2*, *CDH 19*, *CDH 20*, *CDH 36*, *CDH 209*, *ITGBL1*, *ICAM1*, *ITGAD*), регуляции клеточного цикла (# *MADH2*, *MADH4*, *RBI*, *CDK5*, *CDK6*, *CCNA1*, *STAG3*, *RBI*, *CC1*) и иммунной системы (# *TNFSF7*, *TNFSF9*, *LEP*, *HGF*, *IL12*, *RBI*, *CCL24*, *CCL26*, *IFNA1*, *IFNA2*, *IFNA 4*, *IL27*, *IL33*).

При этом, показано, что в 100 % случаев появление новых амплификационных клонов было сопряжено с развитием гематогенных метастазов, у всех остальных больных с элиминацией ОК, отсутствием действия ХТ на клоны или у больных с появлением делеционных клонов не было гематогенных метастазов в 5-ти летний период наблюдения (по методу Каплана-Майера, $p = 0,00001$ Log-rank test) (см. рис.).



Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от появления или элиминации мутантных опухолевых клонов в процессе НХТ

Заключение

Впервые получены доказательства того, что при проведении НХТ метастазирование опухоли молочной железы связано с появлением новых ОК с амплификациями. Установлено, что селекция или новообразования этих клонов может происходить в результате воздействия на опухоль неоадьювантной химиотерапии. Детекция новых амплификационных клонов при проведении предоперационной химиотерапии является неблагоприятным прогностическим фактором РМЖ.

ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЯ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА НА УРОВЕНЬ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ*

INFLUENCE OF TRANSCRIPTION TERMINATION DEFECTS ON THE GENE EXPRESSION LEVEL IN MAMMALIAN CELLS

А. В. Иванкин, Л. В. Болдырева, Е. Н. Кожевникова, А. В. Пиндюрин

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
Новосибирск, Россия*

A. V. Ivankin, L. V. Boldyreva, E. N. Kozhevnikova, A. V. Pindyurin
Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Russia

Аннотация

Мы исследуем влияние нарушения механизма терминации транскрипции на эффективность синтеза белок-кодирующих РНК РНК-полимеразой II (RNAP II) в модельной системе «двойного репортера» у млекопитающих. Мы обнаружили, что делеция одного нуклеотида в 3' области репортерного гена *eGFP* приводит к двукратному усилению его экспрессии (повышению числа транскриптов и количества белка eGFP) в культивируемых клетках, как мыши, так и человека. Мы выяснили, что эта делеция, расположенная в 32 п.н. ниже сигнала полиаденилирования, приводит к стабильному разрезанию транскрипта в пределах 2–12 нуклеотидов ниже сигнала полиаденилирования.

Abstract

We explore the influence of transcription termination defects on protein-coding RNA synthesis efficiency by RNA polymerase II in mammalian cells using a double-reporter model system. We have found that one-nucleotide deletion in the 3' region of *eGFP* reporter

* Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №16-14-10288. Project is funded by the Russian Scientific Foundation grant #16-14-10288.

gene causes two-fold increase in both its mRNA level and the eGFP protein production in cultured mouse as well as human cells. We demonstrated that this one-nucleotide deletion located 32 bp downstream of polyadenylation signal results in stable cleavage of transcripts within 2–12 nucleotides downstream of the polyadenylation signal.

У эукариот транскрипция является этапом, который обеспечивает большое число степеней свободы в регуляции уровня экспрессии генов. Комбинация посттранскрипционных модификаций, которые претерпевают вновь синтезированные незрелые мРНК (т.н. пре-мРНК), предопределяет возможность, длительность и эффективность последующей трансляции зрелого транскрипта. Наши исследования направлены на изучение влияния нарушения механизма терминации транскрипции на эффективность синтеза белок-кодирующих РНК РНК-полимеразой II (RNAP II) в модельной системе «двойного репортера» в культивируемых клетках млекопитающих. Фермент RNAP II осуществляет транскрипцию большинства белок-кодирующих генов эукариот, которые нуждаются в точной ткане- и стадие-специфической экспрессии для обеспечения правильного развития и функционирования организма. В основе правильного завершения транскрипции лежат процессы разрезания и полиаденилирования 3' конца транскрипта. Они осуществляются сложным белковым комплексом терминации, для сборки которого необходим, во-первых, определенный набор ковалентных модификаций С-концевого домена RNAP II и, во-вторых, присутствие ряда мотивов в составе 3' области пре-мРНК. Эти мотивы располагаются ниже точки разрезания транскрипта и не входят в состав зрелой мРНК. Нарушения как терминации транскрипции гена, так и полиаденилирования были выявлены в связи с рядом онкологических, иммунологических, неврологических и гематологических заболеваний человека (Cunha et al. 2014). Представления о значении терминации транскрипции в регуляции генной активности только начинают формироваться в мировой науке (Porrua, Libri, 2015; Proudfoot, 2016).

В предыдущих исследованиях мы обнаружили, что делеция одного нуклеотида в 3' области репортерного гена приводит к двукратно-

му усилению его экспрессии в культивируемых эмбриональных стволовых клетках мыши (Akhtar, de Jong, Pindyurin et al., 2013). Целями данной работы явилось исследовать: 1) консервативен ли эффект в других культурах клеток мыши и человека и под индукцией другими промоторами; 2) определить методом 3'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) в какой части транскрипта расположена делеция — в пределах зрелого транскрипта или после точки разрезания. Чтобы нивелировать в экспериментах шумы, возникающие из-за разницы в эффективности трансфекции, мы разработали систему «двойного репортера». Мы создали плазмидную конструкцию, несущую два одновременно экспрессирующихся репортерных гена, один из которых служит нормировочным, второй — исследуемым (рис. 1, а, б). Для стабильной экспрессии во всех типах исследуемых клеток млекопитающих нормировочного гена *mCherry* мы использовали промотор цитомегаловируса (CMV) и терминаторную область вируса SV40. Исследуемым репортерным геном служил *eGFP*, для которого мы использовали 2 варианта промоторов: mPGK и hPGK, и одинарный сигнал полиаденилирования, консервативный для млекопитающих AAUAAA, в 32 п.н. после которого располагалась точечная делеция С в случае мутантного варианта.

Мы выполнили кратковременную трансфекцию культуры эмбриональных фибробластов мыши MEF52BL и культуры клеток эмбриональной почки человека HEK293 указанными конструкциями. Спустя 48 часов после трансфекции мы измерили интенсивность экспрессии репортерного гена *eGFP* двумя способами. Методом количественной ПЦР с тотальной кДНК, синтезированной на основе РНК, выделенной из клеток, мы определили уровень транскрипции *eGFP* для исходной и мутантной конструкций (рис. 2, а). Методом проточной цитометрии мы измерили интенсивность свечения белка eGFP в трансфецированных клетках. Для обеих клеточных линий мы обнаружили усиление экспрессии репортерного гена *eGFP* при трансфекции конструкцией, содержащей точечную делецию как на уровне мРНК, так и зрелого белка (рис. 1, в, 2, а).

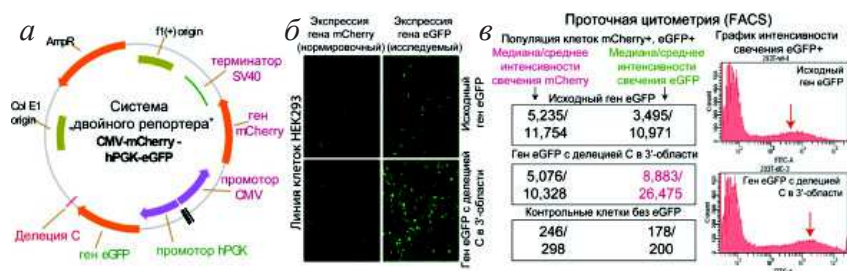


Рис. 1. а — схема плазмидной конструкции «двойного репортера»; б — экспрессия репортерных генов в культуре эмбриональных клеток почки человека HEK293: снимки флуоресцентной микроскопии и в — результаты проточной цитометрии

Затем методом 3'RACE мы получили кДНК библиотеки всех вариантов 3'-концевых областей полиаденилированных транскриптов репортерного гена, синтезированных в клетках. Мы выяснили, что удаление нуклеотида С в положении 32 п.н. ниже сигнала полиаденилирования приводит к стабильному разрезанию транскрипта в пределах 2–12 нуклеотидов ниже сигнала полиаденилирования. В диком типе разрезание транскрипта происходит в пределах 5–35 нуклеотидов ниже сигнала полиаденилирования (рис. 2, б).

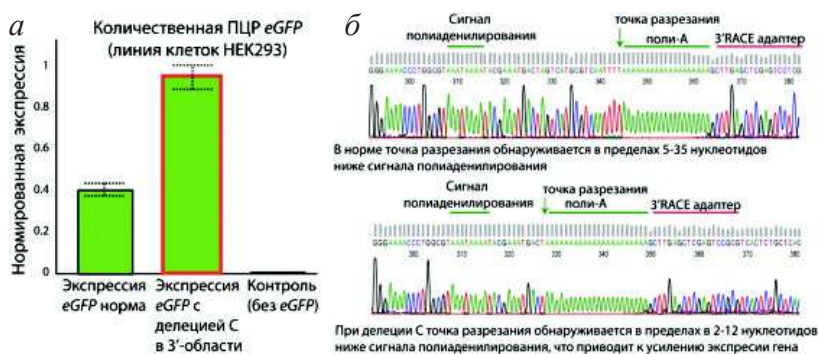


Рис. 2. а — результаты количественной ПЦР, демонстрирующие усиление уровня транскрипции гена *eGFP* в результате делеции С в 3' области гена; б — результат секвенирования библиотек 3'областей транскриптов при экспрессии гена *eGFP* в исходной и мутантной конструкциях

Таким образом, мы показали: 1) эффект делеции одного нуклеотида в 3' области репортерного гена не является ткане- и видоспецифическим, так как выявляется в двух видах культивируемых клеток мыши, и в культивируемых клетках человека; 2) данная однонуклеотидная делеция не входит в зрелые молекулы мРНК; 3) однонуклеотидная делеция приводит к стабильному разрезанию транскрипта в пределах 2–12 нуклеотидов ниже сигнала полиаденилирования, тогда как в исходной конструкции разрезание транскрипта происходит существенно дальше.

Опираясь на полученные данные, мы предполагаем, что однонуклеотидная делеция ниже сигнала полиаденилирования приводит к более эффективному разрезанию транскрипта, в результате чего образуются стабильные зрелые мРНК репортерного гена *eGFP*, что соответствует обнаруженному повышению числа его транскриптов, и повышению количества белка eGFP в клетках, трансфицированных мутантными конструкциями. Мы планируем дальнейшие исследования, нацеленные на выявление механизмов влияния различных мотивов в 3' области гена на уровень его экспрессии в культивируемых клетках человека.

В последнее время растет интерес к влиянию процесса терминирования транскрипции на регуляцию активности генов (Portua, Libri, 2015; Proudfoot, 2016). В связи с этим мы полагаем, что результаты наших исследований расширят знания о регуляции экспрессии генов эукариот в разных организмах и типах клеток, а также найдут практическое применение в генетической инженерии и биотехнологии.

Литература

1. Akhtar W., de Jong J., Pindyurin A. V., Pagie L., Meuleman W., de Ridder J., Berns A., Wessels L. F., van Lohuizen M., van Steensel B. Chromatin position effects assayed by thousands of reporters integrated in parallel // *Cell* — 2013, **154**, 914–927.
2. Curinha A., Oliveira Braz S., Pereira-Castro I., Cruz A., Moreira A. Implications of polyadenylation in health and disease // *Nucleus* — 2014, **5**, 508–519.

3. Porrua O., Libri D. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop // Nat Rev Mol Cell Biol — 2015, **16**: 190–202.
4. Proudfoot N.J. Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut // Science — 2016, **352**, aad9926.

**ИЗУЧЕНИЕ ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТРАНСМИССИВНЫХ
ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ КЛЕЩАМИ
D. RETICULATUS В ГОРОДЕ ТОМСКЕ ***

**PREVALENCE AND GENETIC CHARACTERIZATION
OF CAUSATIVE AGENTS OF TRANSMISSIBLE INFECTIONS,
TRANSMITTED BY D. RETICULATUS IN TOMSK**

М. Ю. Карташов ^{1,2}, Т. П. Микрюкова ¹, В. А. Терновой ¹,
Н. С. Москвитина ³, В. Б. Локтев ^{1,2,3}

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

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Томский государственный университет*

М. Yu. Kartashov ^{1,2}, T. P. Mikryukova ¹, V. A. Ternovoi ¹,
N. S. Moskvitina ³, V. B. Loktev ^{1,2,3}

¹ SRC VB «Vector», Russia

² NSU, Russia

³ TSU, Russia

Аннотация

В клещах *D. reticulatus*, отловленных на территории городского парка г. Томска, выявлена циркуляция *R. raoultii* и *A. phagocytophilum*.

* Работа поддержана грантом РФФИ No 16-34-00425.

Для выявленных изолятов определены нуклеотидные последовательности генов цитратсинтазы (*gltA*) и *groESL*-оперона, соответственно.

Abstract

In *D. reticulatus* ticks, collected in the territory of the city park in Tomsk, identified circulation of *R. raoultii* and *A. phagocytophilum*. For the identified isolates identified the nucleotide sequences of genes *gltA* and *groESL*-operon, respectively.

Актуальность исследования

В последнее время во многих городах России отмечается увеличение численности иксодовых клещей именно в городских биотопах, изменение их видового состава, а также увеличение доли их инфицированности сразу несколькими возбудителями. На сегодняшний день отмечается тенденция к формированию стойких очагов «клещевых» инфекций на городских и пригородных территориях. Клещи, заселяющие парки и скверы представляют особую опасность, поскольку они беспрепятственно попадают на тело человека в связи с тем, что горожане, как правило, не ожидают встречи с ними и не предпринимают специальных мер защиты.

Клещи вида *D. reticulatus* на территории Томской области регистрируется только с 2005 г. (Романенко, 2009) и данных об их инфицированности различными патогенами накоплено крайне мало. Появление на окраине города лесостепного клеща *D. reticulatus*, вероятно, связано с известным фактом потепления климата крупного города по сравнению с удаленными от него местами.

Цель данной работы состояла в определении уровня инфицированности и проведении молекулярно-генетического анализа возбудителей различных трансмиссивных инфекций (вируса клещевого энцефалита, риккетсий, анаплазм и эрлихий) в клещах *D. reticulatus*, отловленных в черте г. Томска.

Материал и методы. В исследование вошла выборка из 315 клещей вида *D. reticulatus* (187 самок и 128 самцов), собранных с растительности на территории городского биотопа «Лагерный сад» в сентябре 2015 г. Лагерный сад, расположенный на высоком берегу реки Томь

в юго-западной оконечности г. Томска, представляет собой один из самых крупных и посещаемых парков. Растительный покров парка сформирован искусственными посадками березы, тополя, сосны, кедра и небольшими участками естественного смешанного леса. Гомогенизацию полученных образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот производили из 100 мкл гомогената с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм РИБО-преп» («НексБио», Россия) согласно инструкции производителя. Скрининг полученных образцов на наличие генетических маркеров различных патогенов проводили с помощью ПЦР, используя специфические праймеры: для детекции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) — праймеры, комплементарные фрагменту гена белка Е ВКЭ; для детекции риккетсий — праймеры, комплементарные фрагменту гена *gltA* (цитратсинтазы); для детекции анаплазм/эрлихий — праймеры, комплементарные фрагменту *groESL*-оперона белков теплового шока. Генотипирование выявленных изолятов патогенов осуществляли путем определения соответствующих нуклеотидных последовательностей и их дальнейшего анализа. Секвенирование продуктов амплификации проводили модифицированным методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программных продуктов Vector NTI Advance v. 11.0, DNASTAR Lasergene v. 7.1 и Unipro UGENE v. 1.23. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с ранее опубликованными при помощи поискового приложения BLAST.

Результаты исследования

Генетический материал вируса клещевого энцефалита не был обнаружен нами ни в одном образце.

ДНК *Rickettsia spp.* была выявлена в 139 клещах, уровень инфицированности таким образом составил $44,1 \pm 2,7$ %. Достоверных различий в уровне инфицированности риккетсиями у самцов и самок

клещей *D. reticulatus* установлено не было (уровень инфицированности самок — $45,4 \pm 3,6 \%$; уровень инфицированности самцов — $42,2 \pm 4,2 \%$). Это соотносится с известным фактом, что хотя количество крови, поглощаемое самцами клещей рода *Dermacentor* значительно ниже количества, поглощаемого самками, питание кровью обязательно для завершения их сперматогенеза и не является препятствием для эффективной передачи возбудителей трансмиссивных инфекций (Якименко В. В. и др., 2013).

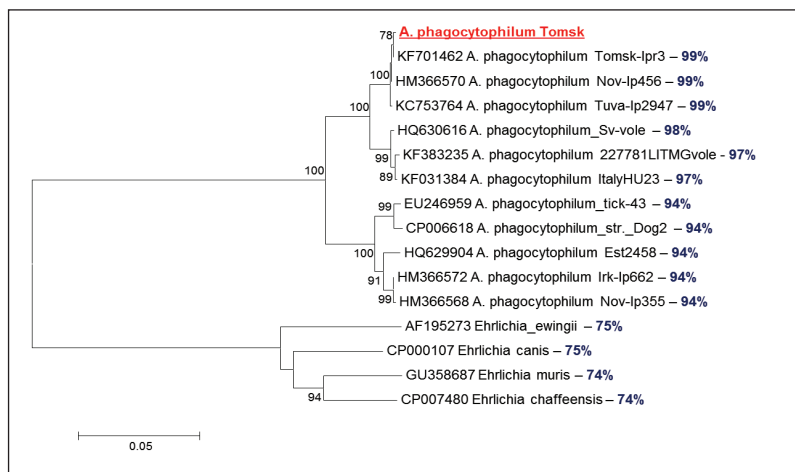
Все выявленные изоляты риккетсий при генотипировании по гену *gltA* были отнесены к *R. raoultii*. Все изоляты оказались идентичны друг другу и на 100 % гомологичны последовательностям гена *gltA* *R. raoultii* штамм Marne (DQ365803), выделенным из клеща *D. reticulatus* на востоке Франции в 2004 г. Уровень гомологии по нуклеотидной последовательности гена *gltA* с прототипными штаммами *R. raoultii* Khabarovsk (DQ365804), выделенным из клеща *D. silvarum* в Хабаровском крае в 2005 г., и *R. raoultii* Elanda-23/95 (EU036985), выделенным из клеща *D. nuttalli* на Алтае в 1995 г., составил 99,9 %. Уровень гомологии соответствующих аминокислотных последовательностей идентичен на 100 % у выявленных нами изолятов риккетсий и прототипных штаммов *R. raoultii* Marne и *R. raoultii* Khabarovsk. В аминокислотной последовательности цитратсинтазы *R. raoultii* Elanda-23/95 имеется два аминокислотных замещения по сравнению с вышеперечисленными штаммами.

В немногочисленных исследованиях *R. raoultii* была обнаружена у клещей рода *Dermacentor* (прежде всего *D. reticulatus*, *D. marginatus* и *D. nuttalli*), отловленных в ряде регионов азиатской части России (Омская область, Республика Бурятия) и Казахстане, также имеются данные о широком распространении *R. raoultii* на территории Китая и Монголии. Риккетсии, генетически близкие *R. raoultii*, были выявлены в клещах *H. hystricis* в Японии и в клещах *H. ornithophila*, *H. shimoga*, *H. lagrangei* в Таиланде, а также в клещах *D. marginatus* в Грузии и Турции. В настоящее время серологическими методами и выявлением ДНК в крови больных подтверждена роль *R. raoultii* в качестве этиологического агента синдрома TIBOLA (**tick-borne lymphadenopathy**), который характеризуется первичным аффектом, окруженным эритемой, разви-

вающимся в месте присасывания клеща, а также болезненностью лимфоузлов в этой области. У больных развивается астенический синдром, в четверти случаев наблюдается лихорадка ($>38^{\circ}\text{C}$). У большинства пациентов эритема сохраняется до 1–2 месяцев.

В ходе исследования в одном образце от самца *D. reticulatus* была выявлена ДНК *Anaplasma phagocytophilum*. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей *groESL*-оперона выявленного изолята составил порядка 99 % с изолятами *A. phagocytophilum*, выделенными из клещей рода *Ixodes* на близлежащих территориях (см. рис.).

A. phagocytophilum известна как возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека. На территории России циркуляция *A. phagocytophilum* была впервые определена в Балтийском регионе России и граничащих с Российским Дальним Востоком северо-восточных районах Китая. В дальнейшем анаплазмы обнаружены в Приморском, Хабаровском и Алтайском краях, на территории Новосибирской, Тюменской, Омской и Челябинской областей.



Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей фрагмента *groESL*-оперона. Жирным красным цветом выделена последовательность выявленного изолята *A. phagocytophilum*. Синим цветом обозначен процент гомологии нуклеотидных последовательностей с выявленным изолятом

Выявление в клещах *D. reticulatus*, обитающих в черте г. Томска, патогенных риккетсий и анаплазм свидетельствует о потенциальной опасности развития риккетсиозов и анаплазмозов у людей вследствие присасывания инфицированных клещей.

РОЛЬ EMT И ENDOMT В ФИБРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ ПРИ ОПИСТОРХОЗЕ *OPISTHORCHIS FELINEUS*

ROLE OF EMT AND ENDOMT IN LIVER FIBROSIS ASSOCIATED WITH *OPISTHORCHIS FELINEUS* INFECTION

А. В. Ковнер ^{1,2}, Г. А. Максимова ¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
экспериментальной и клинической медицины»

² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»

A. V. Kovner ^{1,2}, G. A. Maksimova ¹

¹ FSBSI «Research Institute of Experimental and Clinical Medicine»

² FSBSI «Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences»

e-mail: anya.kovner@gmail.com

Аннотация

В настоящее время, по оценкам ВОЗ, количество людей, подверженных трематодным инфекциям пищевого происхождения, превышает 56 миллионов. *Opisthorchis felineus* является возбудителем описторхоза у рыбоядных млекопитающих в обширном ареале от Восточной Европы до Центральной Азии и является эндемичным для Сибири. Описторхоз, ассоциированный с *O. felineus*, может приводить к различным последствиям, в том числе, включая масштабные

зоны фиброзирования печени. Однако до сих пор остается актуальной фундаментальная проблема механизмов фиброгенеза, данные по которым являются разрозненными, в независимости от сопутствующих болезней. Одним из перспективных кандидатов в образование коллаген-продуцирующих миофибробласт-подобных клеток является эпителиально- и эндотелиально-мезенхимальный переход.

Abstract

Currently, the number of people exposed to infection foodborne trematode, more than 56 million, according to WHO estimates. *Opisthorchis felinus* is the causative agent of opisthorchiasis in fish-eating mammals inhabiting vast territory from Eastern Europe to Central Asia and it is endemic for Siberia. The disease may lead to various effects, including extensive areas of hepatic fibrosis. However, mechanisms of fibrogenesis remain actual fundamental problem with patchy data, regardless of opportunistic diseases. One of the most promising candidates for the formation of collagen-producing myofibroblast-like cells is epithelial- and endothelial to mesenchymal transition.

Введение

Возбудителями трематодной инфекции являются трематодные черви, наиболее распространенными видами из которых, поражающими человека, являются *Clonorchis*, *Opisthorchis*, *Fasciola* и *Paragonimus*. *O. felinus* является возбудителем описторхоза у рыбоядных млекопитающих в обширном ареале от Восточной Европы до Центральной Азии и является эндемичным для Сибири (WHO, 2015; Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A., 2016). Описторхоз, ассоциированный с *O. felinus*, может приводить к различным последствиям, включая масштабные зоны фиброзирования печени. Однако анализ современной литературы не позволяет составить четкого механизма фиброгенеза ни в общем, как о процессе, ни при инфицировании *O. felinus*.

Показано, что миофибробласты являются клетками, которые, в конечном счете, ответственны за тяжелое течение фиброзного процесса (Kendall R. T., Feghali-Bostwick C.A., 2014). Известно, что миофибро-

бласты могут происходить из различных источников фибробластов и stellatных клеток печени (Poslethwaite A. E. et al., 2004; Herzog E. L., Bucala R., 2010; Bansal M. B., 2016). Одним из потенциально возможных механизмов образования миофибробласт-подобных клеток является эпителиально- и эндотелиально-мезенхимальный переход (EMT и EndoMT) (Kramann R. et al., 2015). Однако данные по EMT и EndoMT остаются противоречивыми и их роль в фиброгенезе печени на фоне хронического описторхоза не изучена. Суть обоих процессов сводится к потере эпителиального профиля (E-cadherin) и приобретению мезенхимально-подобного профиля (vimentin).

Материалы и методы

Для проведения данного эксперимента было использовано 75 самцов золотистых сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*), в возрасте 6–8 недель. Животные были разбиты на 2 группы: контрольная и животные, инфицированные 50 метациркариями *O. felineus*. Наличие паразита проверялось с помощью метода эфиро-уксусной копроовоскопии (Pavlyukov I. A., Berezantsev Y. A., 1991).

Общая длительность эксперимента составила 52 недели. Образцы печени забирались у всех групп на 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34 и 52 неделе после инфицирования. Образцы тканей подвергались стандартной гистологической подготовке (Kovner A. V. et al., 2016).

Для исследования соединительной ткани использовались следующие окраски: гематоксилином и эозином (обзорная), пикрофуксином по Ван Гизону (для визуализации элементов соединительной ткани), импрегнация серебром (для визуализации элементов молодой соединительной ткани). Для определения фенотипа клеток-эффекторов, изучения их секреторной активности и механизмов фиброгенеза были использованы иммуногистохимические методы окраски парафиновых срезов после их соответствующей подготовки (Kovner A. V. et al., 2015). Инкубирование со специфическими антителами: CD31, CD34, CD68, CK7, fibroblast (маркеры клеток различного гистогенеза); SMAD2/3, α -SMA, E-cadherin, vimentin (маркеры EMT и EndoMT); TGF β 1 (профиброгенный маркер); GFAP (маркер активации звездчатых клеток печени); Collagen I α (маркер новообразованного коллагена).

Визуализация была проведена на микроскопе Axioskop 2 Plus (Zeiss) с фотокамерой AxioCam MRc (Zeiss). Для морфометрии использовалась закрытая тестовая система из 100 точек площадью 3.52×10^4 мкм² (Ав-тандилов, 2009). Средние величины исследованных параметров определялись с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Statsoft). Достоверными отличия считали при $p < 0.05$ (t-критерий Стьюдента).

Результаты и их обсуждение

При анализе образцов печени в динамике хронического описторхоза нами были выявлены следующие данные. Общее количество соединительной ткани возросло в 2,1 раза с 10 по 52 неделю эксперимента, с превышением контрольных значений уже на 10 неделе в 2,3 раза. При этом общее количество новообразованной соединительной ткани (преобладание коллагенов I и III типа) возрастало с 10 по 52 неделю в 2,6 раза. Следует отметить, что количество фибробластов было примерно одинаковым на всех сроках исследования, в среднем составляя 21 клетку на поле зрения. Количество активированных стеллатных клеток к 10 суткам эксперимента возрастало и составляло, в среднем, 40 клеток на поле зрения. Это позволяет сделать предположение, что эти клетки являются не единственными ключевыми клетками-эффекторами фиброгенеза и источниками коллагена.

TGF- β 1 является одним из ключевых инициаторов фиброгенеза (Hippenstiel S. et al., 2006). Общее количество клеток, экспрессирующих данный маркер, в среднем превышает контрольное значение в 3,3 раза. Такие повышенные уровни экспрессии TGF- β 1 могут быть связаны с его потенциальной возможностью участвовать в генерации миофибробластов через EMT и EndoMT (Piera-Velazquez S., Jimenez S.A., 2012). Одним из возможных путей реализации данных процессов является SMAD-зависимый путь. В каноническом пути, фосфорилируется Smad2/3 и связывается со Smad4 и сложным комплексом транслицируется в ядро (Katsuno Y. et al., 2013). Активированный Smad 2/3/4 тример связывается с Smad-связывающим элементом в регуляторных областях Snail, JunB и C-Jun, что приводит к репрессии генов, связанных с эпителиальным фенотипом и активирует гены мезенхимального фенотипа (van Meeteren L.A. et al., 2012).

Динамика экспрессии маркера SMAD2/3 у клеток различного генеза сильно варьировала: количество SMAD2/3+ клеток Купффера увеличивалось к 22 неделе эксперимента, снижаясь к 52 неделе эксперимента, значительно превышая контрольные значения. Количество SMAD2/3+ холангиоцитов и SMAD2/3+ гепатоцитов увеличивалось к 52 неделе эксперимента в 6,8 и 31,5 раза по сравнению с 10 неделями после инфицирования соответственно. Количество SMAD2/3+ эндотелиоцитов было максимальным с 10 по 18 неделю эксперимента с дальнейшим снижением экспрессии в среднем в 1,5 раза и резким увеличением экспрессии к 52 неделе эксперимента.

Наиболее широко используемым маркером идентификации миофибробластов является цитоскелетный белок α -SMA, который является частью сократительного аппарата и участвует в клеточной подвижности. В большинстве хронических фиброгенных болезней уровень α -SMA повышен, что отражает активацию миофибробластов (Piera-Velazquez S. et al., 2011). В целом экспрессия данного маркера в клетках Купффера, холангиоцитах и гепатоцитах носила одинаковый характер: количество α -SMA+ клеток возрастало к 52 неделе эксперимента в 9,9, 2,9 и 2,2 раза соответственно. Количество α -SMA+ эндотелиоцитов наоборот уменьшалось от 10 к 52 неделе эксперимента в 1,5 раза.

При этом следует отметить, что холангиоциты, экспрессирующие эпителиальный маркер — E-cadherin, уменьшались с 10 к 52 неделе хронического описторхоза в 1,6 раза. В то время как количество данных клеток, экспрессирующих мезенхимальный маркер — vimentin, наоборот, увеличивалось к 52 неделе эксперимента в 2,5 раза. Количество E-cadherin+ гепатоцитов и эндотелиоцитов было примерно одинаковым на всем протяжении эксперимента и в среднем составляло 14 и 7 клеток на поле зрения соответственно, в то время как количество vimentin+ клеток увеличивалось к 52 неделе эксперимента в 3,96 и 2,3 раза соответственно. Такая динамика согласовывается с количеством соединительной ткани и количеством фибробластов и stellatных клеток печени.

Заключение

Количество соединительной ткани нарастало с течением эксперимента с постоянным высоким процентом содержания молодой соединитель-

ной ткани. Важно отметить, что количество фибробластов и stellatных клеток печени на всех сроках инфицирования было примерно одинаковым и, вероятно, это не единственные клетки печени, способные принимать участие в реализации фиброгенеза путем секреции коллагена. EMT и EndoMT одни из ключевых механизмов реализации фиброза печени при хроническом описторхозе, что подтверждается участием в данном процессе гепатоцитов, холангиоцитов и эндотелиоцитов. Активация остальных клеток (макрофагов и фибробластов) с вероятным переходом в миофибробласт-подобные клетки, скорее всего, идет по схожему пути. Однако, вероятно, что SMAD-зависимый путь — не единственный путь реализации EMT и EndoMT в механизмах фиброгенеза в печени при хроническом описторхозе, вызванном *O. felineus*.

**СОЗДАНИЕ ШТРИХКОДИРОВАННЫХ БИБЛИОТЕК
РЕПОРТЕРНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ
ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

**CONSTRUCTION OF BARCODED REPORTER
LIBRARIES TO STUDY THE POSITION EFFECT
IN CULTURED *DROSOPHILA* CELLS**

М. О. Лебедев, Л. А. Яринич, А. В. Пиндюрин

*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS,
Novosibirsk, Russia
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

M. O. Lebedev, L. A. Yarinich, A. V. Pindyurin
IMCB RAS, NSU, Russia

e-mail: m.lebedev@mcb.nsc.ru

Аннотация

Проект направлен на изучение функциональной активности конститутивно активных и индуцируемых промоторов генов в зависимо-

сти от состава локального хроматинового окружения в культивируемых клетках дрозофилы. Для решения данной задачи используется новейший мультиплексный метод TRIP, основанный на piggyBac-опосредованной транспозиции в геном исследуемых клеток нескольких тысяч штрихкодированных репортерных конструкций с последующей идентификацией мест их локализации в геноме и измерением уровня их транскрипционной активности посредством высокопроизводительного параллельного секвенирования. В данной работе были созданы библиотеки штрихкодированных конструкций, содержащие различные промоторные элементы *Drosophila melanogaster*.

Abstract

The study is dedicated to investigation of influence of the local chromatin environment on the activity of promoter elements of different types (constitutively active and inducible ones) in cultured *Drosophila* cells. The novel multiplex approach TRIP based on piggyBac-mediated transposition of thousands of DNA-barcoded reporter constructs into the genome of cells of interest, which is followed by the identification of their genomic localization sites and the measurements of their transcriptional activity using high-throughput sequencing, is used to address the issue. In this project we generated DNA-barcoded plasmid libraries containing different promoter elements of *Drosophila melanogaster*.

Метод TRIP (Thousands of Reporters Integrated in Parallel) позволяет исследовать влияние локального окружения хроматина на активность генов одновременно в тысячах различных локусах генома в культивируемых клеточных линиях. Метод основан на использовании встроенных в геном штрихкодированных репортерных генов при помощи системы транспозона piggyBac. Система для трансгенеза состоит из двух плазмидных конструкций: конструкции для экспрессии транспозазы, катализирующей встраивание репортерного гена в случайное место генома, и конструкции, содержащей терминальные повторы транспозона, между которыми помещен репортерный ген и ДНК штрих-код. ДНК штрих-код — это короткая последовательность длиной около 20 п. н., находящаяся непосредственно перед сайтом полиаденилирования и необходимая для последующей иден-

тификации места интеграции в геном и уровня экспрессии каждого репортерного гена. После трансфекции клеток происходит транспозиция репортерного гена из плазмиды в геном. В дальнейшем из популяции клеток выделяется геномная ДНК для определения мест интеграции репортерных генов методом обратной ПЦР и тотальная РНК, по которой определяется уровень экспрессии каждого отдельного репортерного гена методом обратной транскрипции, последующей ПЦР и высокопроизводительного секвенирования. Необходимо отметить, что благодаря наличию уникальной последовательности ДНК штрих-кода в каждой конструкции, возможно одновременное исследование тысяч интегрированных в геном репортерных генов.

Ранее мы оптимизировали метод TRIP, первоначально разработанный для культивируемых клеток мышей, для его применения на культивируемых клетках дрозофилы, представляющих собой удобный модельный объект для изучения регуляции экспрессии генов. Для различных клеточных линий дрозофилы были подобраны оптимальные методы трансфекции, а также промоторы для наработки достаточного количества транспозазы и увеличения количества встроек репортерных генов в геном.

Целью данной работы является создание штрихкодированных репортерных библиотек, содержащих различные промоторные элементы *Drosophila melanogaster*, для исследования влияния эффекта положения на активность экспрессии генов в масштабе генома в эмбриональных клеточных линиях дрозофилы с помощью метода TRIP.

Для создания плазмидных конструкций мы выбрали несколько конститутивно активных и индуцируемых промоторов, имеющих различную активность (на основе данных FlyBase): промоторы генов *Tbp*, *PuK*, *PCNA*, *Hex-A*, *Hsp70* и *MtnA*. На основе базового TRIP вектора, адаптированного для клеток *Drosophila*, был создан набор уникальных плазмидных конструкций, содержащих репортерный ген *eGFP* под контролем различных промоторов, а также дополнительный уникальный для каждого промотора штрих-код длиной 5 п.н. (так называемый промоторный индекс), расположенный в непосредственной близости к основному штрих-коду. Дополнительное штрихкодирование позволяет одновременно исследовать активности

всех выбранных промоторов в одном эксперименте. Для каждого промотора было создано две конструкции, различающиеся уникальными промоторными индексами, чтобы исключить возможное влияние промоторного индекса на экспрессию репортерного гена. Активность промоторов оценивали после временной трансфекции клеток полученными конструкциями с помощью проточной цитометрии по флуоресценции eGFP и посредством определения уровня экспрессии репортерного гена *eGFP* методом обратной транскрипции и последующей ПЦР в реальном времени. Выбранные для TRIP анализа промоторы характеризуются транскрипционной активностью в широком динамическом диапазоне в культивируемых клетках дрозофилы S2 и Kc167.

Для получения штрихкодированных репортерных библиотек в каждую полученную конструкцию клонировали основной штрихкод. Штрихкодированные репортерные библиотеки для TRIP должны удовлетворять двум основным требованиям: 1) сложность библиотеки должна быть не менее 300 тысяч клонов и 2) загрязнение библиотеки исходной немаркированной штрих-кодом конструкцией должно быть минимально. Для минимизации загрязнения библиотек нештрихкодированной плазмидной конструкцией применяли следующий подход. С использованием прямого праймера, содержащего сайт рестрикции *SalI*, и обратного праймера, содержащего сайт рестрикции *EagI*, амплифицировали фрагмент ДНК, состоящий из штрих-кода длиной 18 п.н., сигнала полиаденилирования и 3'-терминального повтора транспозона *piggyBac*. Далее фрагмент ДНК резали по сайтам рестрикции *SalI* и *EagI* и лигировали в исходный вектор, порезанный по сайтам рестрикции *SalI* и *NotI*. В связи с тем, что рестриктазы *EagI* и *NotI* имеют одинаковые липкие концы, полученная в результате такого гибридного лигирования штрихкодированная репортерная библиотека не содержала данных сайтов рестрикции в отличие от исходного немаркированного штрих-кодом плазмидного вектора, что позволило избавиться от его примеси в полученной библиотеке с помощью ее обработки рестриктазой *NotI*.

Таким образом, нами были получены штрихкодированные плазмидные TRIP библиотеки для встраивания репортерных генов, со-

держающих различные промоторы, и определения влияния локального окружения хроматина на транскрипционную активность генов в масштабе генома модельного объекта дрозифилы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АДЕНОЗИНА В ОБЛАСТИ ОЖГОВОЙ РАНЫ*

PHYSIOLOGICAL ADENOSINE CONCENTRATIONS IN BURNED AREA

К. В. Невская¹, В. В. Иванов¹,
С. В. Кривошеков^{1,2}, Е. С. Майнагашева¹

¹ *ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский
университет Минздрава России*

² *Национальный исследовательский Томский
политехнический университет*

K. V. Nevskaya¹, V. V. Ivanov¹, S. V. Krivoshchekov^{1,2},
E. S. Mainagasheva¹

¹ *Siberian State Medical University, Russia*

² *Tomsk Polytechnic University, Russia*

Аннотация

Аденозин — эндогенный пуриновый нуклеозид, играющий важную роль в процессах регенерации за счет модификации функциональной активности клеток в очаге повреждения. Для понимания механизмов протективного действия аденозина при ожоговой травме нами было проведено исследование концентрации аденозина в ожоговой ране, подлежащей мышечной ткани, а также коже вокруг области ожога. В ходе проведенных работ установлено повышение концентрации аденозина в мышечной ткани, подлежащей под областью

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №26 16-34-00421/16 от 27.01.2016.

ожога, и неповрежденной коже, прилегающей к области ожоговой раны, через 1 и 24 часа после моделирования термической травмы соответственно.

Abstract

Adenosine is an endogenous purine nucleoside that play important role in tissue regeneration by means of cells function modification. We investigated adenosine concentration in burned skin, underlying muscle tissue, undamaged area around the wound to understand the mechanisms of tissue protection by adenosine. We observed increasing of adenosine levels in underlying muscle tissue and undamaged area around the wound after 1 and 24 hours after damage respectively.

Изучение механизмов регенеративного процесса в поврежденной ткани является основой создания патогенетических средств терапии. Известно, что эндогенный пуриновый нуклеозид аденозин способен стимулировать регенерацию тканей преимущественно за счет модификации функциональной активности клеток в очаге повреждения (Valls et al., 2009). Необходимо отметить, что в зависимости от концентрации аденозина активируется тот или иной тип аденозиновых рецепторов (A1, A2A, A2B, A3), что приводит к различным эффектам со стороны клеток: продукции про- или противовоспалительных цитокинов, ангиогенных или ангиостатических факторов и других (Sheth et al., 2014). Таким образом, изучение концентрации аденозина в области повреждения способствует пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе процессов регенерации.

Целью данной работы являлось изучение концентрации аденозина в области ожоговой раны IIIб степени у крыс линии Wistar на разные сроки после повреждения.

Исследование проведено на крысах линии Wistar. Животных содержали в условиях вивария на стандартной диете, предусматривающей свободный доступ к воде и пище. Исследование осуществлялось на основе протоколов, одобренных локальным комитетом по этике ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (заключение № 3897 от 27.10.2014 г.). Термический ожог моделировали у предварительно

наркотизированных животных контактным способом с поражением поверхности кожи, предварительно освобожденной от шерсти, с помощью металлического стержня с постоянной температурой накаливания 200°C при времени экспозиции 10 секунд. Наркоз осуществляли путем однократного внутримышечного введения раствора «Zoletil-100»® («Virbac Sante Animale», Франция) из расчета 2 мг на 1 кг массы тела экспериментального животного. В результате воздействия у животных формировался ожог IIIб степени площадью 4,9 см². Через 1, 24 и 48 часов после термического ожога животные подвергались СО₂-асфиксии с последующим забором фрагментов кожи в области ожоговой раны, неповрежденной кожи, прилегающей к области ожога, а также мышечной ткани, подлежащей под областью ожога. В качестве контроля проводили забор соответствующего материала у интактных животных. Пробоподготовку образцов для проведения ВЭЖХ-анализа проводили, как описано Akula et al. (2008). Анализ проводили с использованием обращенно-фазной колонки Phenomex Luna C18(2) 250 × 4,6 мм, в градиентном режиме элюирования (аналитическая длина волны 260 нм). Содержание аденозина выражали на 1 г исследуемых тканей.

В результате исследования установлено, что через 1 час после моделирования термического ожога происходило увеличение концентрации аденозина в мышечной ткани, подлежащей под областью ожога, в 1,5 раза по сравнению с контролем. Через 24 часа концентрация аденозина повышалась в неповрежденной коже, прилегающей к области ожоговой раны (в 2 раза). Через 48 часов после термического ожога концентрация аденозина во всех изучаемых образцах снижалась, чем в образцах, полученных от животных контрольной группы, что может быть обусловлено его быстрым метаболизмом (Salati et al., 1984)

Необходимо отметить, что уровень аденозина в коже животных контрольной группы был ниже концентрации, вызывающей активацию аденозиновых рецепторов в клетках (Fredholm, 2007). В то же время у животных экспериментальной группы в мышечной ткани (через 1 час после моделирования ожога) и неповрежденной коже, прилегающей к области повреждения (через 24 часа после модели-

рования ожога), была выявлена концентрация аденозина, способная активировать A1 и A3 рецепторы аденозина. Согласно данным литературы, A1 аденозиновый рецептор обладает преимущественно противовоспалительными эффектами на клетку, в то время как A3 — преимущественно противовоспалительными (Lara et al., 2014).

Таким образом, выявленное повышение концентрации аденозина в области ожоговой раны у крыс может оказывать при термическом повреждении преимущественное влияние на регенеративный процесс через активацию A1 и A3 типов аденозиновых рецепторов. Дальнейшее изучение влияния физиологических концентраций аденозина на модификацию функциональной активности клеток позволит более детально изучить механизмы регенеративного процесса и стать основой для разработки новых патогенетически обоснованных подходов в области регенеративной и эстетической медицины.

ОЦЕНКА ВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА БОБОВЫХ ТРАВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-МЕТОДОВ

EVALUATION POLYMORPHISMS LEGUMES USING PCR METHODS

А. П. Новаковская, А. С. Туржанова, О. Н. Хапилина, Р. Н. Календар

РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан

A. P. Novakovskaya, A. S. Turzhanova, O. N. Khapilina, R. N. Kalendar
RSE «National center for biotechnology», Kazakhstan

Аннотация

Для выявления генетического разнообразия бобовых трав ДНК фингепринтинг на основе амплификации высокоповторяющихся PBS последовательностей ретротранспозонов использовали. Имеется высокая вероятность того, что подобные последовательности будут встречаться по всему геному в различных ориентациях и на

короткой дистанции, чтобы была возможна амплификация ПЦР методом. 50 ПЦР праймеров, последовательности которых комплементарны коротким PBS участкам ретротранспозонов, были разработаны. Эффективные праймеры для выявления видового полиморфизма бобовых трав были выделены.

Abstract

To identify the genetic diversity of legumes fingerprinting DNA based on the amplification of highly repetitive sequences of retrotransposons PBS used. There is a high probability that such sequences will occur throughout the genome at different orientations and at a short distance to be able to amplification by PCR. 50 PCR primers, whose sequences are complementary to portions of PBS short retrotransposons developed. Effective primers to detect polymorphisms legumes identified.

Структура генетического разнообразия какой-либо географической популяции определяется способностью этой популяции адаптироваться к конкретным условиям существования путем естественного отбора. Это возникает вследствие низкого коэффициента генетического разнообразия, возникающего ввиду снижения количества возможных комбинаций генов, способствующих приспособляемости к определенным условиям среды. Все это приводит к тому, что в определенной популяции снижается вероятность возникновения продуктивных индивидуумов. Это обуславливает необходимость поддержания и непрерывного расширения генетического разнообразия, что возможно только при изучении его структуры с использованием современных методов. В настоящее время существует много стратегий оценки генетического разнообразия и его структуры: анализ генеалогических схем, полевые эксперименты с использованием количественных методов изучения, изоферменты, а также молекулярно-генетические методы. Из последних наиболее часто для оценки генетического разнообразия используются различного типа маркеры, базирующиеся на оценке полиморфизма анонимных и повторяющихся последовательностей генома: RAPD, SSR и ISSR. В настоящее время существует необходимость поиска нового типа маркеров, которые

бы позволяли выявлять полиморфизм во всех частях генома, включая и некодирующие последовательности. При обеспечении высокой разрешающей способности и производительности, маркеры, используемые для изучения генетического разнообразия, должны обладать способностью к использованию их на различных культурах.

В задачи наших дальнейших исследований входило выделение ДНК из проростков кормовых культур, которое осуществляли с использованием кислого СТАВ-HEPES буфера. Некоторые культуры имели высокую энергию прорастания, у других проблема была в получении неинфицированных проростков. данную проблему успешно решали через получение стерильных проростков на среде, содержащей $\frac{1}{2}$ состава солей по прописи Гамборга В5. В данном случае проростки имели хорошо развитые семядоли, что позволяло эффективно проводить экстракцию ДНК.

Для выявления внутривидового генетического разнообразия и для проведения генетического анализа и маркерной селекции использовали ДНК фингепринтинг (iPBS амплификация), на основе амплификации высокоповторяющихся PBS последовательностей. Данный подход, основан на том, последовательности ПЦР праймеров комплементарны коротким (до 18 нуклеотидов), PBS участкам из ретротранспозонов, которые универсальны для всех ретротранспозонов и относятся к высокоповторяющимся повторам высших эукариот. Имеется высокая вероятность того, что подобные последовательности будут встречаться по всему геному в различных ориентациях и на короткой дистанции, чтобы была возможна амплификация ПЦР методом.

Нами было разработано более 50 ПЦР праймеров, комплементарных PBS участкам различных ретротранспозонов, с целью подбора наиболее эффективных для ДНК-фингепринтинга многолетних бобовых трав. Все разработанные нами PBS- праймеры были протестированы для определения их эффективности выявления полиморфизма в ДНК фингепринтинге у люцерны. К неэффективным относили праймеры, которые не образуют или образуют несколько ампликонов, разной интенсивности и не выявляющие полиморфизм между образцами.

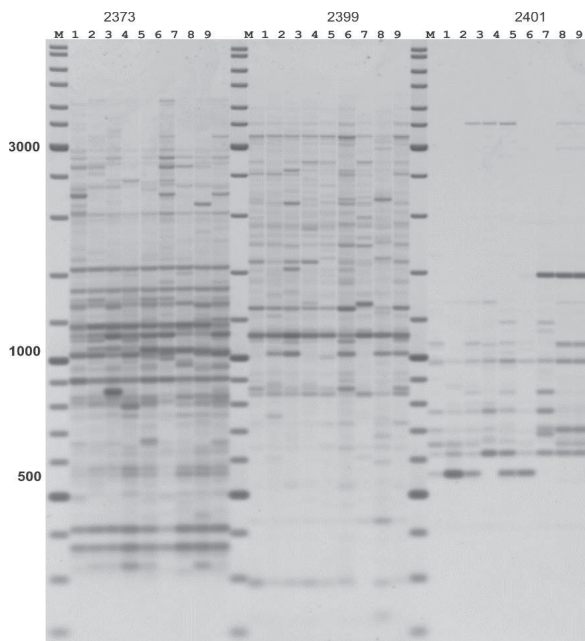
Амплификацию проводили при следующих условиях: первичная денатурация при 98 °C в течение 3 мин; затем 31 цикл, состоящий

из денатурации при 98°C в течение 10 сек, затем отжиг 30 сек при 50°–65 °C в зависимости от праймера и элонгация в течение 1 мин при 72 °C, конечная элонгация проводилась при 72 °C в течении 2 мин.

Кроме того, для обеспечения максимального выхода и специфичности продукта амплификации с PBS праймерами, в каждом конкретном случае использования ПЦР была проведена оптимизаций условий реакции по температуре отжига. Оптимальность условий амплификации определяли по степени стабильности спектра амплификации как высокомолекулярными продуктами, так и низкомолекулярными ампликонами. Как показали исследования, почти у всех разработанных праймеров наблюдали высокую эффективность фингерпринтинга.

В результате амплификации были определены лучшие универсальные к ретротранспозонам, PBS праймеры, которые были использованы для дальнейшей работы для выявления внутри-видового молекулярно-генетического полиморфизма кормовых бобовых трав (см. рис.).

Проведенные исследования показали, что iPBS технология имеет высокую дифференцирующую способность, а также стабильность спектров амплификации. Насыщенность спектров амплификации позволяет получать



Результаты амплификации ДНК линий люцерны с PBS праймерами (2273, 2399 и 2401)

уникальные генетические профили исследуемых образцов, т. е. идентифицировать их.

Преимуществом данного подхода является то, что при использовании меньшего количества праймеров (в сравнении с другими методами анализа), возможно получить достаточное количество дескрипторов, обладающих высоким уровнем полиморфизма, что позволит в дальнейшем разработать метод мультиплексной детекции генотипов люцерны. В дальнейших исследованиях необходимо увеличить количество используемых маркеров для выявления как можно большего количества полиморфных дескрипторов, что позволит повысить эффективность молекулярно-генетической паспортизации.

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТРЕМАТОДЫ
OPISTHORCHIS FELINEUS ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХОЗЯИНА
АНТИГЕЛЬМИНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ ПРАЗИКВАНТЕЛ**

**GENE EXPRESSION CHANGES IN TREMATODE
OPISTHORCHIS FELINEUS AFTER *IN VIVO* TREATMENT
WITH AN ANTHELMINTIC DRUG PRAZIQUANTEL**

Д. С. Пирожкова

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт
цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»*

D. S. Pirozhkova

FSBSI «Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences»

e-mail: pirozhkova@bionet.nsc.ru

Аннотация

Празиквантел является основным препаратом для лечения трематодозов, в том числе описторхоза, вызываемого *Opisthorchis felineus*.

На основе данных секвенирования РНК были найдены гены *O. felineus*, дифференциально экспрессирующиеся в ответ на празиквантел *in vivo*. В работе была использована модель описторхоза на золотистых хомяках, 145 дней после инфицирования. Было обнаружено, что трехкратное введение празиквантела в течение дня изменяло экспрессию в 10 раз большего количества генов, чем двукратное введение препарата. Были установлены основные группы генов *O. felineus*, экспрессия которых увеличивается после трехкратного введения хозяину празиквантела.

Abstract

Praziquantel is the primary agent for the treatment of trematode infections including cases associated with *Opisthorchis felineus*. Based on RNA sequencing data the differentially expressed *O. felineus* genes were found after the treatment with praziquantel *in vivo*. Golden hamster model of opisthorchiasis (145 days post infection) was used. It was found that when animals were treated with 3 doses of praziquantel per day 10-fold more parasitic genes showed changed expression compared to 2 doses per day. The major groups of genes that are up-regulated in response to praziquantel were determined.

Введение

Возбудитель описторхоза *Opisthorchis felineus* — плоский червь класса Trematoda, паразит рыбоядных млекопитающих (в т.ч. человека), который распространен на территории стран СНГ, особенно в бассейнах рек Обь и Иртыш. Основным препаратом, используемым для лечения описторхоза и других трематодозов, является празиквантел. Он изменяет проницаемость мембран клеток паразита для кальция, вызывая паралич. При этом празиквантел повреждает тегумент паразита, делая его уязвимым для иммунной системы хозяина. Этот эффект хорошо изучен для других трематод — кровяных сосальщиков (*Schistosoma*) (Jiraungkoorskul, 2005, Shuhua, 2009).

В представленной работе оценивается эффект празиквантела, вводимого хозяину, на экспрессию генов *Opisthorchis felineus*.

Материалы и методы

Для данного исследования была использована модель описторхоза на золотистых хомяках *Mesocricetus auratus*. Через 145 дней после инфицирования животные получали празиквантел дважды или трижды с интервалом 6 часов по 25 мг/кг веса в каждый прием (доза, рекомендованная для человека при трехкратном употреблении в течение суток). Черви, извлеченные из хозяина через сутки после первого введения празиквантела, были использованы для создания и секвенирования библиотеки с помощью технологии Illumina Solexa (Pomaznoy, 2016). Для поиска дифференциально экспрессирующихся генов данные, полученные при массовом параллельном секвенировании, были проанализированы программами RSEM и edgeR. Из всех дифференциально экспрессирующихся генов были выбраны те, для которых $\log FC > 1$ (увеличение экспрессии в 2 и более раз), $\log FC < -1$ (уменьшение экспрессии в 2 и более раз), $\log CPM > 4$. Данные по экспрессии генов, полученные с помощью секвенирования РНК, были проверены с помощью SYBR Green Real-time PCR.

Результаты и обсуждение

Было обнаружено, что трехкратное введение празиквантела вызывает увеличение экспрессии 661 гена паразита, и уменьшение — 1000 генов (при выбранных пороговых значениях). Двукратное введение празиквантела влияло на экспрессию генов значительно меньше: только у 54 генов наблюдалось увеличение экспрессии, у 88 — уменьшение.

Реакция *O. felineus* на празиквантел во многом сходна с *S. japonicum*. В частности, у обоих видов активируются гены ABC-транспортёров различных групп, а также других трансмембранных переносчиков ионов и незаряженных молекул, гены белков мышц и тегумента, цитоскелетных белков, гранулинов, катепсинов, ферментов системы убиквитина, а также многих компонентов кальциевого сигнального пути. Специфической особенностью изменения транскрипционного профиля описторха в ответ на празиквантел является менее выраженная, чем у шистосом, активация генов, связанных с синаптической передачей, а именно, со слиянием мембранных везикул с синаптической мембра-

ной. У *S. japonicum*, увеличивают экспрессию, по крайней мере, вдвое 10 генов этой группы (Yoo, 2013), в то время как у *O. felineus* — только 2. Кроме того, у шистосомы активируются гены противодействия окислительному стрессу (Yoo, 2013), а у описторха — нет. Помимо перечисленных особенностей, было обнаружено, что у *O. felineus* под воздействием празиквантела значительно повышается экспрессия гена уроканат-гидратазы (деградация гистидина).

Для предварительного подтверждения дифференциальной экспрессии с помощью Real-time PCR было выбрано 3 гена. Экспрессия двух из них, а именно рианодинового рецептора (RyR) и отоферлина (Otof), продукты которых взаимодействуют с внутриклеточным кальцием, увеличивалась под воздействием празиквантела. Третий ген — фруктозабисфосфат-альдолаза (FBPA) подавляется празиквантелом. Результаты Real-time PCR согласуются с данными по дифференциальной экспрессии, полученными при секвенировании. В качестве нормирующего был использован ген GAPDH, стабильность экспрессии которого была подтверждена для близкородственного паразита (Yoo, 2008). Данные по экспрессии генов, полученные при секвенировании РНК, подтверждают стабильность экспрессии этого гена в условиях описанного эксперимента.

Продукты многих генов, экспрессия которых возрастает после лечения празиквантелом, являются секретируемыми белками паразита (многие катепсины, гранулины, уроканат-гидратаза и т. д.) (Львова, 2014). Для некоторых из этих белков показано, что они способны воздействовать на клетки хозяина (Liang, 2013, Smout, 2015). Полученные результаты подчеркивают важность гепатопротекции при терапии описторхоза.

Заключение

Представленные данные показали, что третья обработка празиквантелом является критической в плане влияния на паразита, а именно на его транскрипционный профиль. Были выявлены группы генов *O. felineus*, экспрессия которых изменяется наиболее заметно после лечения хозяина празиквантелом. Дифференциальная экспрессия некоторых генов была предварительно подтверждена количественной PCR.

Благодарности

Автор благодарит М. Д. Логачеву (МГУ), выполнившую секвенирование РНК, и М. Ю. Помазного (ИЦИГ СО РАН), выполнившего биоинформатический анализ данных, полученных при секвенировании.

Литература

1. Jiraungkoorskul W., Sahaphong S., Sobhon P., Riengrojpitak S., Kangwanransan N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice, *Parasitology International*, 2005 Sep; 54(3):177–83.
2. Liang P., Sun J., Huang Y., Zhang F. et al. Biochemical characterization and functional analysis of fructose-1,6-bisphosphatase from *Clonorchis sinensis* *Molecular Biology Reports*, 2013 July; 40(7):4371–4382.
3. Pomaznoy M. Y., Logacheva M. D., Young N. D., Penin A. A., Ershov N. I., Katokhin A. V., Mordvinov V. A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felineus*. *Parasitology International*, 2016 Feb; 65(1):12–19.
4. ShuHua X., BingGuia S., Cholletb J., Tanner M. Tegumental alterations in juvenile *Schistosoma haematobium* harboured in hamsters following artemether treatment. *Parasitology International*, 2001 Sep; 50(3):175–83.
5. Smout M. J., Sotillo J., Laha T., Papatpremsiri A. et al. Carcinogenic Parasite Secretes Growth Factor That Accelerates Wound Healing and Potentially Promotes Neoplasia. *PLoS Pathogens*, 2015 Oct; 11(10): e1005209.
6. Yoo W. G., Kim T. I., Li S., Kwon O. S., Cho P. Y., Kim T. S., Kim K., Hong S. J. Reference genes for quantitative analysis on *Clonorchis sinensis* gene expression by real-time PCR. *Parasitology Research*, 2009 Jan; 104(2):321–328.
7. You H., McManus D. P., Hu W., Smout M. J., Brindley P. J., Gobert G. N. Transcriptional responses of *in vivo* praziquantel exposure in schistosomes identifies a functional role for calcium signalling pathway member CamKII. *PLoS Pathogens*, 2013 Mar; 9(3):e1003254.

8. Львова М. Н., Дужак Т. Г., Центалович Ю. П., Катохин А. В., Мордвинов В. А. Секретом марины печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*. Паразитология, 2014; 48(3):169–184.

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА

THE PROPERTIES OF RECOMBINANT ANTI-MULLERIAN HORMONE AS A POTENTIAL ANTINEOPLASTIC AGENT

А. Я. Рак, А. В. Трофимов, А. В. Петров, А. М. Ищенко

*ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт
особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург*

A. Y. Rak, A. V. Trofimov, A. V. Petrov, A. M. Ischenko

e-mail: alexandrak.bio@gmail.com

Abstract

Anti-müllerian hormone (AMH) is a glycoprotein of the TGF- β superfamily. In mammalian embryogenesis it determines the development of male reproductive system, and in postnatal life — regulates the synthesis of sex hormones [1]. To date, AMH is known as a marker of fertility in men and women. With appearing some data about the antineoplastic activity of recombinant AMH [3, 4], it became necessary to study the most important properties of hormone such as the pharmacokinetics and the ability of full-length hormone and its derivatives to bind to MISRII. In this work we detected a preferential ability of C-terminal dimer and fragmented form of recombinant AMH to bind to recombinant MISRII and demonstrated the presence of MISRII on the surface of human ovary and breast adenocarcinoma cells. We also first investigated the pharmacokinetics of recombinant AMH in mice and the character of its fragmentation *in vivo*.

Антимюллеров гормон (АМГ) — гликопротеин, принадлежащий суперсемейству TGF- β , полноразмерная форма которого является гомодимером с молекулярной массой около 140 кДа. Как и у большинства членов данного суперсемейства, в молекуле АМГ имеется сайт специфического протеолиза, в результате которого его молекула разделяется на N- и C-концевой гомодимеры (с молекулярной массой 110 кДа и 25 кДа, соответственно), которые затем образуют нековалентно связанный комплекс. В эмбриогенезе млекопитающих АМГ определяет развитие половой системы по мужскому типу, а в постнатальной жизни — регулирует синтез половых гормонов [1]. Известно, что запуск сигнального пути с участием АМГ начинается с его связывания с рецептором II типа (MISRII) [2]. При этом имеющиеся к настоящему времени в литературе сведения о том, какое именно производное АМГ обладает способностью к взаимодействию с MISRII и необходим ли специфический протеолиз гормона для проявления его функциональной активности, являются противоречивыми. В современной клинической практике АМГ известен в качестве маркера фертильности как у мужчин, так и у женщин. Однако не так давно появились сведения и о противоопухолевой активности рекомбинантного АМГ [3, 4], что вызвало необходимость исследования его свойств как потенциального лекарственного агента. Целью настоящей работы стало исследование важнейших свойств рекомбинантного АМГ — характера фрагментации его молекул *in vitro* и *in vivo*, а также способности к связыванию с MISRII полноразмерного гормона и его производных. В экспериментах были использованы мыши линии Balb/c, препараты рекомбинантного АМГ и химерных белков exMISRII+Fc и exMISRII+hinge+Fc производства ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, а также гистологический материал, любезно предоставленный клинико-диагностической лабораторией ФГОУ ВПО СПБМАПО после получения информированного согласия от пациентов. В исследовании были применены методы иммуногистохимического и иммуноферментного анализа (ИФА). В рамках выполнения работы с помощью специально разработанной тест-системы обнаружена преимущественная способность

к связыванию с MISRII С-концевого димера рекомбинантного АМГ и фрагментированной формы гормона. Показана преимущественная способность этих форм АМГ к связыванию с рекомбинантным MISRII, а также присутствие этого специфического рецептора на поверхности клеток аденокарциномы яичника и молочной железы человека. Наконец, впервые исследована фармакокинетика рекомбинантного АМГ у мышей и выявлено наличие позитивной корреляции между интенсивностью выведения гормона из циркуляции и степенью его фрагментации, что может свидетельствовать о необходимости фрагментации гормона для связывания его со специфическим рецептором в тканях.

Литература

1. Гукасова Н. В., Северин С. Е. Белок MIS: структура, регуляция экспрессии и молекулярный механизм действия // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2005. № 4. С. 3–9.
2. Di Clemente N. et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- β // Molecular Endocrinology. 2010. Vol. 24. №. 11. P. 2193–2206.
3. Barbie T. U. et al. Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100. № 26. P. 15601–15606.
4. Kim J. H., MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors //Obstetrics & gynecology science. 2014. Vol. 57. № 5. P. 343–357.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОГЕНОВ ПРОТИВ ВИЧ-1,
ВКЛЮЧАЮЩИХ ЭПИТОПЫ
ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ MPER ВИЧ-1**

**DESIGNING OF IMMUNOGENS AGAINST VICH-1 INCLUDING
EPITOPES OF SHIROKONEYTRALIZUYUSHCHY ANTIBODIES
OF MPER OF VICH-1**

А. П. Рудомётов ¹, Н. Б. Андреева ¹, А. Ю. Бакулина ^{1,2}, Д. Н. Щербаков ¹

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

² *ГОУ «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет»*

A. P. Rudometov ¹, N. B. Andreeva ¹, A. Bakulina ^{1,2}, D. N. Shcherbakov ¹

¹ SRC VB «Vector», Russia

² NSU, Russia

Аннотация

Несмотря на усилия мирового сообщества, с момента открытия ВИЧ-1 и до сегодняшнего дня не разработана вакцина, которая бы защитила от заражения данным вирусом. Одним из перспективных направлений в разработке вакцин против ВИЧ-инфекции является создание иммуногена, способного воспроизводимо стимулировать в организме образование антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра первичных изолятов ВИЧ-1 (или bNabs — broadly neutralizing antibodies).

Abstract

Despite efforts of the world community, from the moment of opening of HIV-1 and till today the vaccine which would protect from infection with this virus isn't developed. One of the perspective directions in development of vaccines against HIV infection is creation of an immunogen capable is reproduced to stimulate in an organism

formation of the antibodies having neutralized activity concerning a wide range of primary HIV-1 isolates (or bNabs — broadly neutralizing antibodies).

Согласно статистике, приведенной UNAIDS, в 2015 году число людей, живущих с ВИЧ-1, составило 36,7 миллионов. Около 40 миллионов людей уже нет в живых из-за болезней, опосредуемых СПИ-Дом. В настоящее время основным средством сдерживания эпидемии ВИЧ-1 является высоко активная антиретровирусная терапия (БААРТ). Несмотря на то, что использование БААРТ не позволяет элиминировать ВИЧ-1 из организма больного, в мире выделяются колоссальные финансовые ресурсы на обеспечение всех нуждающихся в БААРТ, так как это позволяет снизить распространение вируса и продлить жизнь инфицированных ВИЧ-1.

С момента открытия ВИЧ-1 и до сегодняшнего дня не разработана вакцина, которая бы защитила от заражения данным вирусом. В то же время считается, что только разработка и внедрение эффективной вакцинации против ВИЧ-1 даст возможность остановить пандемию ВИЧ-1-инфекции.

Принцип любой вакцины — это создать устойчивый иммунитет к инфекционному агенту. В случае вируса иммунного дефицита человека классические подходы по созданию вакцины против него, такие как использование аттенуированного или инактивированного вируса оказались не эффективны, так как связаны с опасностью инфицирования: иммунитет ограничен очень узким кругом вирусных изолятов, а продолжительность иммунитета достаточно мала и не позволяет индуцировать появление цитотоксических лимфоцитов. Однако, клинические испытания, проведенные в Таиланде, показали, что вакцина RV 144 обеспечивала хотя и скромный, но достоверный уровень защиты (31 %). Полученные результаты свидетельствуют о том, что вакцину создать можно, но необходимо проводить работу над повышением ее эффективности. В связи с этим, на первый план выходят альтернативные технологии дизайна иммуногенов.

Одним из перспективных направлений в разработке вакцины против ВИЧ-инфекции, является включение в состав рекомбинантных

белков эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых антителами, нейтрализующих широкий спектр первичных изолятов (bNabs) ВИЧ-1. В качестве носителя можно подобрать такой каркасный белок, который имеет структуру, наилучшим образом имитирующую природное окружение эпитопа ВИЧ-1, с которым взаимодействует bNab.

Первым шагом в разработке таких иммуногенов является идентификация эпитопов bNabs. Они могут быть идентифицированы с использованием данных рентгеноструктурного анализа структур Env (поверхностных гликопротеинов ВИЧ) в комплексе с bNabs. Альтернативным методом определения эпитопов bNabs может быть фаговый дисплей. Успешность этого подхода была продемонстрирована при предсказании известных ключевых аминокислотных остатков нескольких эпитопов bNabs, таких как 4E10 и Z13.

Так как эпитопы bNabs зачастую конформационные — т. е. представляют собой регионы, собранные воедино в трехмерной структуре, необходимо конструирование молекул, в которых бы данные эпитопы повторяли свою конформацию. При помощи компьютерных алгоритмов были спроектированы скафолды, в которых эпитопы повторяли нативное расположение аминокислот вирусного эпитопа в пределах структуры Env.

В работах последних лет показано, что иммуногены-скафолды способны индуцировать наработку широконейтрализующих антител. Вполне вероятно, что несколько различных скафолдов, презентующих один и тот же эпитоп, или один скафолд несущий модифицированные варианты одного и того же эпитопа, могут быть использованы в стратегии иммунизации, чтобы избежать фокусировки иммунного ответа на сам скафолд и обеспечить аффинное созревание bNabs.

Ранее, был выбран и частично охарактеризован глобулярный белок *B. subtilis* YkuJ (113 а.о.), конформационная структура концевых участков которого наиболее близка к конформации эпитопов bNab 10E8 и позволяет включить одновременно два эпитопа. 10E8.

При проектировании нуклеотидной последовательности, кодирующей скафолд, в его состав были заложены две нуклеотидные последовательности эпитопа bNabs 10E8 по N- и C-концам, фланкированные уникальными сайтами рестрикции для клонирования

гена в составе плазмиды и возможности изменения нуклеотидной последовательности эпитопов. Эта модификация необходима для создания на основе каркасного белка YkuJ-MPER, панели экспериментальных иммуногенов, способных вызвать выработку широконейтрализующих антител. Ключевым условием такого процесса, является презентация иммунной системе возможного аминокислотного разнообразия MPER поверхностного гликопротеина ВИЧ-1. Разнообразие эпитопов было получено на основе пептидов отобранных, в трех раундах аффинной селекции с моноклональным широконейтрализующим антителом Z13 (которое также связывается с MPER). Таким образом, было получено 5 вариантов белка-иммуногена YkuJ-MPER-1–5 с переменными эпитопами, нуклеотидная последовательность конструкций была подтверждена секвенированием.

Все варианты белка YkuJ-эпитоп bNab были наработаны и очищены для иммунизации мышей, по нескольким разным стратегиям.

Искусственные белки-иммуногены YkuJ-MPER-1–5 были наработаны в препаративном количестве и очищены с помощью металл-хелатной хроматографии. Для подтверждения того, что все варианты YkuJ-MPER связываются с антителом 10E8, был проведен вестерн-блот анализ. Он подтвердил, что переменные эпитопы MPER в составе искусственного белка распознаются МКА 10E8. Полученными иммуногенами была проведена иммунизация лабораторных животных (мышей линии BALB/c и кроликов). Иммуногенность рекомбинантных белков определяли в ИФА. Анализ сывороток иммунных животных выявил высокие титры (до 1:125 тыс.) антител взаимодействующих с иммуногенами.

**РАЗРАБОТКА НОВОГО АГЕНТА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ
DARPin_MCHERRY_PE40 НА ОСНОВЕ БЕЛКА
С АНКИРИНОВЫМИ ПОВТОРАМИ***

**DEVELOPMENT OF NEW AGENT FOR THERANOSTICS
DARPin_MCHERRY_PE40 ON THE BASE OF ANKYRIN
REPEAT PROTEIN**

Е. А. Сусллова, Д. С. Сибрикова, Г. М. Прошкина, С. М. Деев

*Институт Биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова Российской Академии Наук (ИБХ РАН)*

E. A. Souslova, D. S. Sibrikova, G. M. Proshkina, S. M. Deyev
Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian
Academy of Sciences (IBCH RAS)

Аннотация

Разработка новых методов и подходов для высокочувствительной детекции и высокоселективной терапии онкологических заболеваний на сегодняшний день — одна из наиболее актуальных и активно развивающихся областей биологии и медицины. Эти подходы объединяет тераностика, занимающаяся созданием препаратов, позволяющих одновременно визуализировать очаг болезни, оказывать терапевтическое воздействие на него и следить за кинетикой доставки лекарства. Повышение эффективности терапевтического воздействия на патологический очаг и безопасности для здоровых тканей в большой степени зависит от правильного выбора молекулярной мишени и селективности воздействия на нее. В настоящей работе представлен новый белковый тераностический агент DARPin-mCherry-PE40, объединяющий адресную, диагностическую и терапевтическую функции.

* Работа была осуществлена при поддержке гранта МК-6957.2016.4.

Abstract

Development of new methods and approaches for highly sensitive detection and highly selective oncotherapy are nowadays one of the most actual and rapid growing fields of biology and medicine. These approaches are combined in theranostics, which is establishing agents, enabling simultaneous visualization of focus of disease, exerting therapeutic action and monitoring kinetics of drug delivery. Improvement of the effectiveness of therapeutic action on abnormal focus and safety for healthy tissues to a greater extent depends on the right choice of molecular target and selectiveness of action on it. Here we present new protein theranostic agent DARPIn-mCherry-PE40, combining target-focused, diagnostic and therapeutic functions.

Онкомаркер HER2 является терапевтической мишенью для антител и ингибиторов киназ при лечении HER2-положительных опухолей. Гиперэкспрессия рецептора HER2 свидетельствует об агрессивности и инвазивности опухоли и обычно коррелирует с неблагоприятным прогнозом развития заболевания. Для усиления цитотоксического эффекта антитела (или их фрагменты) конъюгируют с токсинами, получая таргетные иммунотоксины. Однако антитела, используемые для специфической доставки цитотоксического модуля, зачастую характеризуются низким уровнем экспрессии, склонностью к агрегации и ограниченным проникновением в ткани. Ранее был разработан новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы на основе искусственных белков с анкириновыми повторами — DARPins (Design Ankyrin Repeat Proteins). DARPins не содержат остатков цистеина, что позволяет продуцировать их непосредственно в цитоплазме *E. coli* и характеризуются высоким уровнем экспрессии в бактериальной системе, мономерны при физиологических условиях, не склонны к агрегации и устойчивы к протеазам, а также обладают меньшим размером, что способствует лучшему проникновению в ткани. Кроме того, DARPins менее иммуногенны, чем антитела, и быстрее выводятся из организма, что уменьшает общую токсичность препаратов на их основе. Поэтому они более перспективны

в качестве альтернативных адресных модулей в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для диагностики и терапии различных заболеваний.

Целью настоящей работы было оценить свойства DARPin9_29 в качестве таргетного модуля в составе рекомбинантного иммунотоксина для специфической элиминации HER2-позитивных раковых клеток. Были разработаны два рекомбинантных адресных токсина, scFv-4D5_mCherry_PE40 и DARPin_mCherry_PE40, состоящие из трех функциональных частей: 1) варибельного фрагмента гуманизированного мини-антитела scFv-4D5, специфичного к 4 внеклеточному субдомену HER2 или белка с анкириновыми повторами DARPin9_29 аналогичной специфичности, 2) цитотоксичного фрагмента PE40 псевдомонадного экзотоксина А, вызывающего необратимое ингибирование белкового синтеза в клетках эукариот, и 3) флуоресцентного дальне-красного белка mCherry, позволяющего визуализировать взаимодействие иммунотоксина с HER2 рецепторами на поверхности клеток и проследить его дальнейшее распределение в клетках и тканях.

Было показано, что на этапе выделения рекомбинантный белок DARPin_mCherry_PE40 нарабатывался в бактериальной культуре с гораздо большей эффективностью, чем scFv-4D5_mCherry_PE40. Кроме того, DARPin_mCherry_PE40 более стабилен, чем scFv-4D5_mCherry_PE40, который деградировал при выделении, поэтому DARPin_mCherry_PE40 был отобран для дальнейшего исследования цитотоксического действия на HER2-положительные раковые клетки.

Для определения специфической цитотоксичности гибридного токсина DARPin-mCherry-PE40 был использован спектрофотометрический МТТ-тест жизнеспособности HER2-гиперэкспрессирующих клеток SK-BR-3 в сравнении с HER2-отрицательными клетками линии CHO. Было показано, что обработка HER2-положительных клеток SK-BR-3 рекомбинантным белком DARPin-mCherry-PE40 приводит к специфическому снижению жизнеспособности этих клеток в диапазоне пикомолярных концентраций ($IC_{50}=3.5$ пМ). В то же время для клеток CHO, не экспрессирующих рецептор HER2, значи-

мый цитотоксический эффект в указанном диапазоне концентраций иммунотоксина DARPin-mCherry-PE40 не наблюдался. Полученные данные свидетельствуют о высокой избирательной цитотоксичности DARPin-mCherry-PE40 по отношению к опухолевым клеткам, гиперэкспрессирующим онкомаркер HER2.

Было показано, что все три домена в составе рекомбинантного иммунотоксина DARPin-PE40-mCherry сохранили свои функциональные свойства: высокую аффинность к опухолевому антигену, флуоресценцию и высокоселективную цитотоксичность. Таким образом, был разработан новый перспективный агент для тераностики DARPin_mCherry_PE40, обладающий как диагностическим так и терапевтическим действием и способный одновременно узнавать с высокой селективностью, специфически окрашивать и проявлять высокую избирательную цитотоксичность по отношению к HER2-положительным раковым клеткам.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК И РИСК РАЗВИТИЯ ПРИВЫЧНОГО НЕ- ВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ *

GENETIC POLYMORPHISM OF DNA BASE-EXCISION REPAIR GENES AND RISK OF RECURRENT PREGNANCY LOSS

М. Б. Хаджиева ^{1,2}, О. А. Зимина ³

¹ *Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН,
Москва, Россия*

² *Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия*

³ *Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия*

M. B. Khadzhieva ^{1,2}, O. A. Zimina ³

¹ *N. I. Vavilov Institute of General Genetics,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

² *Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology
and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, Russia*

³ *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow,
Russia*

e-mail: m.had@mail.ru

Аннотация

Нами было выполнено ассоциативное исследование генов эксцизионной репарации оснований ДНК (*LIG3*, *NEIL1*, *OGG1*, *FEN1* и *NTHL1*) в связи с риском развития привычного невынашивания беременности (ПНБ) в ходе которого были выявлены рискованные аллели rs1052133-G (*OGG1*) и rs4462560-G (*NEIL1*).

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №16-34-01322 мол_a).

Abstract

This study was conducted to investigate the association of polymorphisms of DNA base-excision repair genes (*LIG3*, *NEIL1*, *OGG1*, *FEN1* and *NTHL1*) with recurrent pregnancy loss (RPL). We revealed significant associations of SNPs rs1052133 (*OGG1*) and rs4462560 (*NEIL1*) with RPL.

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) — это самопроизвольное прерывание беременности два и более раза подряд в срок до 22 недель, является одной из важнейших проблем практического акушерства. ПНБ рассматривается как многофакторное заболевание, причинами развития которого являются анатомические, эндокринные, инфекционные, иммунные и хромосомные аномалии, однако в 23–40 % случаев этиология ПНБ остается невыясненной. По данным ресурса DisGeNet (<http://disgenet.org/>) в связи с развитием данной патологии изучено более 70 генов-кандидатов; преимущественно это гены иммунной системы, гемостаза, метаболизма гормонов, дисфункции эндотелия, клеточной адгезии и другие. Существенный вклад в стабильность генома вносит эксцизионная репарация оснований (BER), которая удаляет повреждения, вызываемые окислением, дезаминированием, алкилированием азотистых оснований. В первом триместре беременности происходит активное деление как фетальных, так и материнских клеток, следовательно, неполноценная работа системы репарации критична для развития плода. Полиморфные варианты генов репарации обуславливают значительные различия в эффективности репарации повреждений ДНК и тем самым потенциально способны приводить к накоплению мутаций. Несмотря на это, вклад генов репарации в развитие ПНБ практически не исследован.

Целью настоящей работы явилось изучение роли полиморфных вариантов генов эксцизионной репарации оснований (BER) в развитии привычного невынашивания беременности: сайты rs1052536 гена *LIG3* (ligase III, DNA, ATP-dependent), rs4462560 гена *NEIL1* (nei endonuclease VIII-like 1), rs1052133 гена *OGG1* (8-oxoguanine DNA glycosylase), rs174538 гена *FEN1* (flap structure-specific endonuclease 1) и rs2516738 гена *NTHL1* (nth like DNA glycosylase 1). В исследовании приняли участие 532 женщины, из которых 331 страдали

ПНБ (от двух и более случаев) и 201 были с реализованной репродуктивной функцией и отсутствием НБ в анамнезе; средний возраст составил 32.63 ± 5.69 и 33.71 ± 6.14 лет, соответственно. Материалом послужили образцы ДНК из лимфоцитов периферической крови. Женщины были прогенотипированы методом тетра-праймерной аллель-специфической ПЦР. Методом χ^2 оценивали соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга. Оценки частот генотипов и их эффектов были получены методом логистического регрессионного анализа с помощью компьютерной программы SNPStats.

Все изученные варианты находились в состоянии равновесия по Харди-Вайнбергу. В общей выборке с поправкой на возраст и индекс массы тела пограничная значимость в ассоциации с ПНБ была выявлена для генотипа rs4462560-G/G гена *NEIL1* (рец. модель, $P = 0.058$, OR = 2.04, 95 % ДИ: 0.94–4.43). При стратификации выборки по сроку гестации на момент прерывания беременности (до 8.5 недель включительно и более 8.5 недель) были зарегистрированы рискованные аллели rs1052133-G гена *OGG1* (дом. модель, $P = 0.035$, OR = 1.67, 95 % ДИ: 1.04–2.70) и rs4462560-G гена *NEIL1* (рец. модель, $P = 0.045$, OR = 2.35, 95 % ДИ: 0.99–5.60) в группе с более поздним сроком (более 8.5 недель), в то время как в группе со сроком до 8.5 недель статистически значимых результатов не получено. Как *OGG1*, так и *NEIL1* участвуют в репарации окисленных под действием активных форм кислорода (АФК) оснований. Известно, что содержание АФК в плаценте с 8 недели постепенно увеличивается более, чем в два раза (PMID:11106583). Чрезмерная продукция АФК может вызвать ряд нарушений, в частности, спровоцировать спонтанный аборт, невынашивание беременности, преэклампсию, задержку внутриутробного роста (PMID:22748101), в связи с чем функциональная недостаточность генов BER, в том числе *OGG1* и *NEIL1*, может быть критична. Таким образом, дальнейшее изучение генов эксцизионной репарации оснований в гене-зе ПНБ является важной задачей медицинской генетики.

**ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ
ПОЛИМОРФИЗМОВ С ИЗМЕНЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕ-
ЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ
ХИМИОТЕРАПИИ**

**STUDY LINKS SNPS CHANGE RESISTANCE GENES
EXPRESSION IN BREAST CANCER DURING NEOADJUVANT
CHEMOTHERAPY**

М. М. Цыганов^{1,2}, И. В. Дерюшева^{1,3},
М. К. Ибрагимова^{1,2}, Н. В. Литвяков^{1,2}

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национально исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»*

² *Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной
биомедицины, Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования «Национальный
исследовательский Томский государственный университет»*

³ *Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Сибирский
государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации*

M. M. Tsyganov^{1,2}, I. V. Deryusheva^{1,3}, M. K. Ibragimova^{1,2}, N. V. Litvyakov^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk NRMС

² Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine,
Tomsk State University

³ Siberian State Medical University

Аннотация

Ранее нами были получены данные о коэкспрессии в опухоли молочной железы при проведении неоадьювантной химио-

терапии (НХТ) 4-х генов ABC-транспортёров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* ($r = 0,27-0,81$, $p < 0,05$), (Litviakov, N.V., et al., 2013; Литвяков Н.В. и др., 2013). Кроме этого было показано, что данные гены образуют функциональный экспрессионный кластер, повышение экспрессии которого приводит к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Несмотря на то, что все исследованные гены ABC располагаются в разных хромосомах, было высказано предположение о том, что механизмы регуляции генов ABC могут быть связаны с индивидуальными генетическими особенностями, определяемыми однонуклеотидным полиморфизмом (SNP-single nucleotide polymorphism). Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение связи однонуклеотидных полиморфизмов с изменением экспрессии (повышением и снижением) ABC-транспортёров в процессе НХТ.

Abstract

Earlier contact data coexpression in breast tumors were obtained during neoadjuvant chemotherapy (NAC) 4 ABC transporter genes: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* ($r = 0,27-0,81$, $p < 0,05$), (Litviakov N.V., et al, 2013; Litviakov N.V., et al, 2013). Additionally it was shown that these genes constitute a functional expression cassette, which leads to increased expression of formation phenotype of multidrug resistance (MDR). Despite the fact that all the investigated ABC genes located on different chromosomes, it has been suggested that the ABC regulation mechanisms of genes may be linked to individual genetic characteristics determined by single nucleotide polymorphism (SNP-single nucleotide polymorphism). Thus, the aim of this work was to study SNPs due to the expression of change (increase and decrease) of ABC-transporters in the NAC.

Материалы и методы

В исследование было включено 88 больных РМЖ со стадией ПА — ПВ, получавших в 2006–2010 годах лечение в клинике Томского НИМЦ. Больные в неoadъювантном режиме получали 2–4 курса ХТ по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, цикло-

фосфан) или САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода). Затем проводилась операция и 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. РНК выделяли из 88 парных образцов до и после лечения с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Оценку экспрессии генов МЛЮ: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* проводили при помощи qRT-PCR. Относительная экспрессия была оценена с помощью метода Pfaffl, относительно гена-рефери *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы. ДНК выделяли из 88 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany), (Litviakov, N.V., et al., 2013).

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) *высокой плотности* фирмы *Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array*, которые содержат *по 750 000* SNP для каждого больного. Ассоциацию изменения уровня экспрессии генов ABC с SNP оценивали с использованием языка программирования «R» в программе «R version 3.0.2.». Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения использовалась поправка Бонферрони. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера.

Результаты

В результате проведенного анализа было установлено, что с изменением экспрессии одновременно четырех генов лекарственной устойчивости: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2* сопряжено 12 полиморфизмов. При чем, дикий или мутантный генотип каждого из которых связан либо с повышением экспрессии генов ABC, либо со снижением (Таблица 1).

Если генотипировать опухоль молочной железы до лечения по идентифицированным SNP, то на обучающей выборке можно с 80 % эффективностью прогнозировать направление изменения экспрессии кластера генов ABC и формирование фенотипа адаптивной МЛЮ и как следствие эффект НХТ.

Таблица 1

**Полиморфизмы и генотипы, сопряженные
с изменением экспрессии кластера генов ABC**

SNP	Повышение ABC	Снижение ABC
<i>RGSL1</i> rs169154	<i>AA</i>	<i>CC</i>
<i>NOL10</i> rs10207885	<i>CC</i>	<i>TT</i>
<i>NOL10</i> rs6432113	<i>TT</i>	<i>CC</i>
<i>NOL10</i> rs6732429	<i>TT</i>	<i>CC</i>
<i>NPAS2</i> rs4851377	<i>TT</i>	<i>CC</i>
<i>CCDC37</i> rs4679239	<i>CC</i>	<i>TT</i>
<i>SI</i> rs9290221	<i>GG</i>	<i>AA</i>
<i>PDZD2</i> rs6896052	<i>CC</i>	<i>GG</i>
<i>ZNF804B</i> rs17147002	<i>GG</i>	<i>AA</i>
<i>CCDC132</i> rs6960173	<i>GG</i>	<i>CC</i>
<i>HYKK</i> rs952215	<i>CC</i>	<i>TT</i>
<i>TMC5</i> rs7188161	<i>AA</i>	<i>GG</i>

Примечание. Каждый из генотипов представленных SNP связан с определенным направлением изменения экспрессии. Красным цветом обозначены мутантные генотипы.

Далее проспективно была проверена эффективность полученной панели SNP. В тестовую выборку вошли 7 пациентов, у которых до лечения были определены найденные SNP (Таблица 1). Если у пациента были все или подавляющее большинство генотипов сопряженных с повышением экспрессии, то считалось, что в процессе химиотерапии уровень экспрессии *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* будет повышаться, и наоборот, если в подавляющем большинстве случаев были установлены генотипы, связанные со снижением экспрессии, то говорили, что в процессе химиотерапии уровень экспрессии генов МЛУ будет снижаться (таблица 2).

Таблица 2

Проспективная валидация панели 12 SNP для прогнозирования формирования в опухоли молочной железы фенотипа МЛУ

SNP / N пациента	1	2	3	4	5	6	7
rs169154	CA	CA	CA	AA	AA	CC	CA
rs10207885	CT	TT	CT	TT	CT	CC	CC
rs6432113	CC	CC	CT	CC	CC	TT	TT
rs6732429	CT	CC	CT	CC	CT	TT	TT
rs4851377	CT	CT	CT	TT	CT	CT	CT
rs4679239	CC	TC	CC	TC	CC	TT	TC
rs9290221	AA	AA	AA	AA	AA	GG	AA
rs6896052	CG	GG	CC	CG	GG	GG	CC
rs17147002	GA	GG	GA	GA	AA	GA	GG
rs6960173	CC	GC	GG	GG	GC	GC	GG
rs952215	TT	CT	TT	CT	CT	TT	CT
rs7188161	GA	AA	GA	GA	AA	GA	GA
За повышение	80 %	71 %	40 %	57 %	57 %	50 %	14 %
За снижение	20 %	29 %	60 %	43 %	43 %	50 %	86 %
Итоговый прогноз	↑	↑	↓	↑	↑	↑↓	↓
Реальное наблюдение	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓

Примечание. Красным цветом выделены ячейки, в которых генотипы полиморфизмов связаны с повышением экспрессии генов ABCB1, ABCC1, ABCC2 и ABCG2; зеленым — со снижением; синим — гетерозиготный генотип. ↑ — повышение экспрессии кластера генов ABC и формирование фенотипа МЛУ; ↓ — снижение экспрессии кластера генов ABC.

Оказалось, что в 6/7 (86 %) случаях определение генотипов 12 SNP позволило прогнозировать снижение или повышение экспрессии генов ABC. У одного пациента (14 %) наблюдалось равное количество генотипов, связанных с повышением и снижением экспрессии.

Выводы

Идентифицирована и валидирована панель 12 полиморфизмов, у которых дикий и мутантный генотип в опухоли до лечения сопряжен со снижением либо с повышением экспрессии кластера 4-х генов ABC. Генотипирование опухоли молочной железы по этим SNP до лечения позволяет с высокой эффективностью прогнозировать формирование фенотипа МЛУ (80 % и 86 % для обучаемой и тестовой выборок, соответственно).

Литература

1. Litviakov N. V., Cherdyntseva N. V., Tsyganov M. M., Denisov E. V., Garbukov E. Y., Merzliakova M. K., Volkomorov V. V., Vtorushin S. V., Zavyalova M. V., Slonimskaya E. M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2013. V. 71, № 1. P. 153–163.
2. Литвяков Н. В. Градиентный феномен экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии: связь с прогрессированием заболевания // Сибирский онкологический журнал. 2013. V. 58. № 4. P. 5–11.

**СОЗДАНИЕ СЕНСОРНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ
С ПОВЕРХНОСТНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ЗАРОДЫШЕВОЙ
ФОРМЫ ВИЧ-СПЕЦИФИЧНОГО ШИРОКО
НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА VRC01 ***

**ENGINEERED SENSOR B-CELL LINE WITH SURFACE
EXPRESSION OF GERMLINE-REVERTED VERSION OF HIV-
SPECIFIC BROADLY NEUTRALIZING ANTIBODY VRC01**

Д. С. Черникова ^{1,2}, А. А. Горчаков ^{1,2}, С. В. Кулемзин ²,
К. О. Баранов ², О. Ю. Волкова ², А. В. Таранин ^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
г. Новосибирск

D. S. Chernikova ^{1,2}, A. A. Gorchakov ^{1,2}, S. V. Kulemzin ²,
K. O. Baranov ², O. Y. Volkova ², A. V. Taranin ^{1,2}

¹NSU

²IMCB SB RAS, Russia

Аннотация

В настоящее время одним из самых перспективных направлений в разработке вакцины против ВИЧ-инфекции является создание иммуногена, способного индуцировать аффинное созревание широко нейтрализующих антител. Для поиска иммуногенов и оценки эффективности активации ими В-клеток, несущих на своей поверхности незрелую форму широко нейтрализующего антитела, необходимо создание тест-системы, максимально приближенной к человеку. Такой клеточной моделью может служить линия-сенсор с поверхностной экспрессией зародышевой формы широко нейтрализующего антитела в виде В-клеточных рецепторов. В данной работе в качестве

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 16-04-00915).

такого тестового антитела использовалась зародышевая форма широко нейтрализующего антитела VRC01.

Abstract

Identification of antigens driving affinity maturation of broadly neutralizing antibodies is one of the most challenging tasks in HIV vaccinology. In order to isolate such candidate immunogens and to estimate how well they may activate B-cells having surface expression of the immature/germline forms of broadly neutralizing antibodies, a robust test system closely mimicking human B-cell biology would be indispensable. Developing a human B-cell sensor line with surface expression of a germline variant of broadly neutralizing antibody may help achieve this goal. In this work, we used germline-reverted version of a broadly neutralizing antibody VRC01 to create such a sensor B cell line.

Создание эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека является актуальной и до сих пор нерешенной задачей инфекционной иммунологии. Все дело в том, что ВИЧ обладает уникальным набором свойств, защищающих его от воздействия клеток иммунной системы хозяина. Основным препятствием при разработке вакцины является огромное генетическое разнообразие вариантов ВИЧ. Так, большинство антител, появляющиеся при ВИЧ-инфекции или иммунизации традиционными ВИЧ-антигенами, направлены против доминантных изменчивых эпитопов ВИЧ и являются специфичными к определенному вирусному изоляту. Вследствие этого их нейтрализующие свойства легко преодолеваются в силу высокой генетической изменчивости вируса. Очевидно, что для эффективной защиты против ВИЧ-инфекции вакцина должна индуцировать образование антител, способных нейтрализовать максимальное разнообразие генетических вариантов вируса. Такие антитела, демонстрирующие высокую нейтрализующую способность, направлены против консервативных областей (так называемых областей уязвимости, необходимых вирусу для проникновения в клетку-мишень), и называются широко нейтрализующими антителами (далее bnAb). Появление данных антител наблюдается только у части ВИЧ-инфицированных и по истечении длительно-

го времени после проникновения вируса в организм (спустя 1–3 года), что связано с длительным путем созревания уникальных комбинаций зародышевых V-генов соответствующих bnAb. Примечательно, что антигены ВИЧ не взаимодействуют с продуктами таких зародышевых форм bnAb и, как следствие, не способны стимулировать активацию и созревание соответствующих крайне редких В-клеток. Таким образом, в настоящее время механизм появления широко нейтрализующих антител в организме не известен.

В рамках стратегии вакцинации, направленной на генерацию в организме пула bnAb, необходимо разработать серию иммуногенов, способных стимулировать пролиферацию В-клеток, экспрессирующих зародышевые формы bnAb и обеспечить направленное созревание зародышевых предшественников в зрелые формы bnAb. Способность иммуногенов стимулировать зародышевые предшественники bnAb может быть тестирована на специально созданных сенсорных В-клеточных линиях с поверхностной экспрессией зародышевой формы ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела.

Целью данной работы являлось создание функциональной стабильной сенсорной линии с поверхностной экспрессией glVRC01, — зародышевой версии ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела VRC01. Данное антитело обладает исключительной нейтрализующей активностью (по разным оценкам достигающей 88–93 %), а кроме того, способно нейтрализовать 100 % вирусов ВИЧ субтипов А и В, наиболее распространенных на территории РФ.

В результате данной работы была создана лентивирусная конструкция, кодирующая сенсор на основе зародышевой версии широко нейтрализующего антитела glVRC01. Для получения вирусных частиц была проведена котрансфекция клеточной линии HEK293T полученной лентивирусной конструкцией и паковочными плазмидами. Данные вирусные частицы затем использовались для трансдукции целевой клеточной линии В-клеточной лимфомы человека DG-75. Используя метод Ca-flux, было проведено функциональное тестирование полученной сенсорной линии.

В настоящее время полученная сенсорная линия используется для тестирования невирусных иммуногенов, направленных против

широко нейтрализующего антитела VRC01. При инкубации кандидного иммуногена с сенсорной линией о наличии или отсутствии взаимодействия между кандидатным иммуногеном и антителом на поверхности клетки-сенсора можно судить, используя FACS-анализ, а способность данного иммуногена активировать В-клетку, несущую на поверхности зародышевую форму широко нейтрализующего антитела можно оценить, используя метод Ca-flux.

В связи с тем, что широко нейтрализующее антитело VRC01 характеризуется высоким уровнем соматического гипермутагенеза в ходе аффинного созревания из зародышевой в зрелую форму, мы работаем над созданием целой серии сенсорных линий, имитирующих промежуточные стадии созревания антитела VRC01, что позволит оперативно проводить тестирование иммуногенов, направляющих развитие В-клеточного ответа в сторону зрелой формы VRC01.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ УБИКВИТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ TRAP150 И BCLAF1 *

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF DOMAIN STRUCTURE OF UBIQUITIN-BINDING PROTEINS TRAP150 AND BCLAF1

А. Л. Чернорудский

*ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная
медицинская академия» Минздрава России*

A. L. Chernorudskiy
Nizhny Novgorod State Medical Academy, Russia

e-mail: chal@nizhgma.ru

Аннотация

Белки TRAP150 и BCLAF1 являются компонентами сплайсосомы и способны связывать убиквитин. Данная работа посвящена биоин-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-02534).

форматическому анализу указанных белков с целью идентификации потенциальных убиквитин-связывающих доменов. Полученные данные позволяют предположить, что за взаимодействие с убиквитином отвечает центральный участок этих белков с характерной спиральной структурой.

Abstract

Proteins TRAP150 and BCLAF1 are spliceosomal components able to bind ubiquitin. The present study aims to identify potential ubiquitin-binding domains of these proteins by means of bioinformatic analysis. The data obtained allow to presume that interaction with ubiquitin is mediated by central region of these proteins with characteristic spiral structure.

Белки TRAP150 и BCLAF1 являются компонентами сплайсосомного комплекса и принимают участие в процессах созревания и сплайсинга пре-мРНК, распада мРНК, а также в регуляции апоптоза и клеточного ответа на повреждения ДНК. Результаты ранее проведенного нами протеомного скрининга и иммуноблоттинга свидетельствуют, что белки TRAP150 и BCLAF1 способны связывать убиквитин, причем обладают определенной специфичностью к его мономерной форме. Предполагается, что это взаимодействие играет роль в регуляции сплайсинга и других процессов, в которых участвуют вышеназванные белки. Таким образом, эти белки должны иметь специфические домены, ответственные за указанное взаимодействие. Такой домен (или домены) может стать первым известным представителем семейства убиквитин-связывающих доменов (ubiquitin-binding domains, UBD) с выраженной специфичностью к моноубиквитину. Нами был проведен детальный анализ структуры белков TRAP150 и BCLAF1 с целью идентификации новых доменов. Было установлено, что оба белка являются в значительной степени неупорядоченными. Тем не менее, отдельные участки последовательности обладают признаками глобулярной структуры. Для белка TRAP150 (Q9Y2W1) это участок 550–680 и более короткие последовательности в области аминокислотных остатков ~80–120 и 880–920. Так как ни один из известных убиквитин-свя-

зывающих доменов не был найден в неупорядоченных участках, было решено сосредоточиться на изучении этих потенциально глобулярных участков. Анализ консервативности аминокислотных последовательностей выявил 2 консервативных участка — в области 580–730, что соответствует предсказанному глобулярному участку, и в области 860–940 с неопределенным статусом упорядоченности. Первый, наиболее консервативный потенциальный домен, был идентифицирован в 3-х белках протеома человека, включая THRAP3/TRAP150, BCLAF1 и неохарактеризованный белок CXorf23. Нами не было выявлено сходство этого потенциального домена с известными представителями семейства UBD или другими доменами с известной функцией. Второй участок, соответствующий аминокислотам 860–940 в белке TRAP150 человека, менее консервативен и также обнаружен в 3-х белках: THRAP3/TRAP150, BCLAF1 и CASC3/MLN51. Следует отметить, что белок CASC3/MLN51 является компонентом молекулярного комплекса, осуществляющего сшивку экзонов (exon-joining complex) и таким образом имеет непосредственное отношение к процессам сплайсинга. Функция белка CXorf23 на данный момент не определена.

В целом, проведенный анализ позволяет предположить, что именно центральный наиболее консервативный участок является искомым убиквитин-связывающим доменом, так как его предсказанная структура соответствует характерной спиральной структуре других известных представителей семейства UBD.

**РОЛЬ ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ MACAB *SERRATIA*
MARCESCENS В СЕКРЕЦИИ ГЕМОЛИЗИНОВ И ПРОТЕАЗ**

**THE ROLE OF *SERRATIA MARCESCENS* MACAB EFFLUX
PUMP IN SECRETION OF HEMOLYSIN AND PROTEASE**

Т. В. Ширшикова ¹, И. В. Хиляс ¹, Л. Е. Матросова ¹,
М. Р. Шарипова ¹, Л. М. Богомольная ^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский)
федеральный университет, Россия

² Центр здоровья техасского университета A&M,
Брайан, Техас, США

T. V. Shirshikova ¹, I. V. Khilyas ¹, L. E. Matrosova ¹,
M. R. Sharipova ¹, L. M. Bogomolnaya ^{1,2}

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Texas A&M University Health Science Center, Bryan, Texas, USA

e-mail: tatyana-shirshikova@yandex.ru; LMBogomolnaya@kpfu.ru

Аннотация

Serratia marcescens — грамотрицательная бактерия, способная вызывать внутрибольничные инфекции. Однако, знания о факторах вирулентности этой бактерии очень ограничены. Был получен мутант с инактивированными генами эффлюкс системы MacAB *S. marcescens* и проведена сравнительная характеристика внеклеточной гемолитической и протеолитической активности штаммов мутантного и дикого типов. Показано, что способность к секреции протеаз зависит от функционирования эффлюкс систем MacAB.

Abstract

Serratia marcescens is a Gram-negative bacterium that can cause nosocomial infections. However, virulence factors of this bacterium are not fully characterized. *S. marcescens macAB* deletion mutant

was constructed and used to compare hemolytic and proteolytic activity secreted by wild type and mutant strains. It has been shown that the ability to secrete protease depends on the presence of intact MacAB efflux pump.

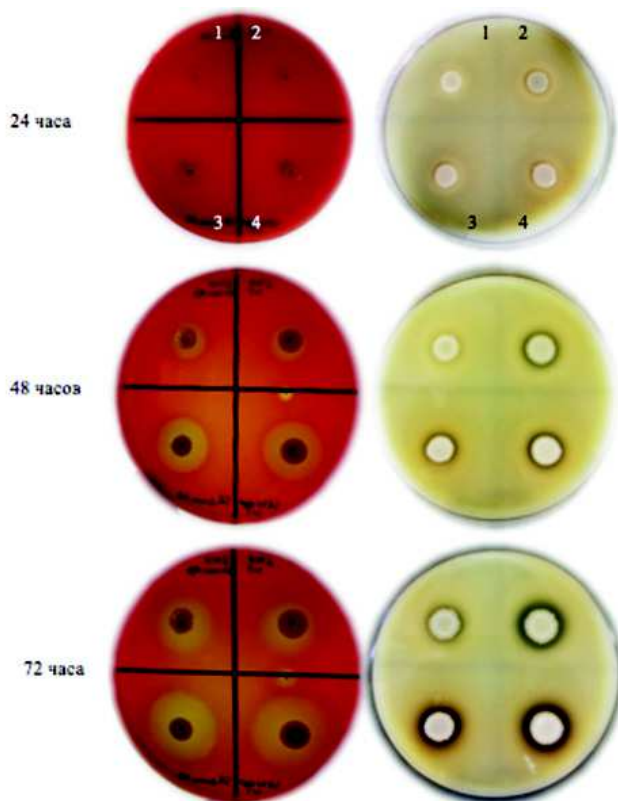
Грамотрицательная бактерия *Serratia marcescens* широко распространена в естественных условиях и в последнее время является опасным возбудителем внутрибольничных инфекций у пациентов с пониженным иммунным статусом. Лечение таких инфекций часто затруднено из-за множественной антибиотикоустойчивости бактерий [Mahlen *et al.*, 2011]. Одним из механизмов, обеспечивающих клеткам *S. marcescens* повышенную устойчивость к широкому спектру антибиотиков, является активное удаление их из клеток с помощью эффлюкс систем. В клетках *S. marcescens* в настоящее время охарактеризованы 6 эффлюкс систем [Марданова и др., 2014]. Кроме того, секретируемые внеклеточные ферменты, в том числе несколько типов протеаз, гемолизины, относятся к факторам вирулентности *S. marcescens* [Shimuta *et al.*, 2009].

Целью работы являлась сравнительная характеристика пигментированных и беспигментных штаммов *S. marcescens* и их мутантов по генам эффлюкс системы по гемолитической и протеолитической активности.

Штаммы *S. marcescens* штаммы SM6 и SR41–8000 были получены от Майкла Бенедика (Texas A&M University). *S. marcescens* SM6 является диким типом, выделяющим пигмент красного цвета, штамм *S. marcescens* SR41–8000 является беспигментным, однако, окрашивает среду в желто-коричневый цвет. Мутантные штаммы $\Delta macAB$ были получены с использованием модифицированного метода гомологичной рекомбинации [Kamaletdinova *et al.*, 2016].

Исследуемые штаммы выращивали в течение 18 часов, при температуре 37 °C в среде LB, содержащей 20 мкг/мл хлорамфеникола для мутантных штаммов. Пять миллилитров каждой культуры центрифугировали при 10000 g в течение 2 минут, осадок дважды промывали стерильной дистиллированной водой. Далее осадок ресуспендировали в 500 мкл стерильной дистиллированной воды. Для исследования гемолитической активности 5 мкл клеточной суспензии (OD 600

нм = 0.5) были нанесены на чашки Петри с кровяным агаром, содержащий колумбийский агар с 5 % овечьей крови (BioRad). Протеолитическую активность определяли с использованием чашек Петри с молочным агаром. 5 мкл клеточной суспензии (OD 600 нм = 0.5) были нанесены на центр агара, содержащего 1 % триптона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl, 3 % сухого обезжиренного молока. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 72 часов.



Сравнительная характеристика секреции гемолитической и протеолитической активности клетками *Serratia marcescens*. Зоны гемолиза (слева) и протеолитическая активность (справа) штаммов *S. marcescens*: 1 — SM6 Δ macAB; 2 — SM6 дикий *mun*; 3 — SR41-8000 Δ macAB; 4 — SR41-8000 дикий *mun*

Как видно из рисунка, на 48 час инкубирования как пигментированные (SM6), так и беспигментные клетки (SR41–8000) *S. marcescens* начинают секретировать в среду гемолизины и протеазы. Очевидно, что штамм SR41–8000 выделяет в среду гемолитические ферменты более активно по сравнению со штаммом SM6.

Инактивация эффлюкс системы MacAB не оказывала влияния на секрецию гемолитических ферментов у обоих штаммов, однако, секреция протеаз в отсутствие эффлюкс системы MacAB проходила менее эффективно у штамма *S. marcescens* SM6. Через 72 часа инкубирования разница между уровнем секреции протеаз у дикого и мутантного штаммов *S. marcescens* SM6 стала более значительной. В это же время также появилась разница между секрецией протеаз штаммами мутантного и дикого типов во втором штамме — *S. marcescens* SR41–8000.

Полученные данные свидетельствуют о возможной связи секреции протеаз и функционированием эффлюкс системы MacAB, а также иллюстрируют внутривидовое разнообразие, наблюдаемое у *S. marcescens*.

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Баранова С. В., Бунева В. Н., Невинский Г. А. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ЛЕГКИЕ ЦЕПИ АНТИТЕЛ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ ГИСТОНЫ	3
Богдан Н. Ю., Коев Г. В. БИОРАЗНООБРАЗИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ КОЗЬЕГО МОЛОКА	6
Волкова Н. В., Шаньшин Д. В., Щербаков Д. Н., Иматдинов И. Р. СОЗДАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ЗИКА	12
Глаголев В. И., Попова Е. Д., Овчинников А. И., Джавахи В. В. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА ТАКРОЛИМУСА МУТАНТНЫМ ШТАММОМ <i>STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS</i> T41-5	14
Демченко А. Г., Петрухин И. Ю., Каширин В. В. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ АКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРУЕМОЙ ШТАМ- МОМ <i>GLUCONACETOBACTER HANSENI</i>	18
Ермолаев В. В., Клименко В. П., Гогина Я. С., Лебедев Л. Р. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК БАКТЕРИОФАГА Ф6 ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВ	22

Железниченко Т. В., Новикова Т. И., Банаев Е. В., Асбаганов С. В., Воронкова М. С., Мазуркова Н. А., Филиппова Е. И. ИНДУКЦИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ (HAIRY ROOTS) <i>NITRARIA SCHOBERI</i> И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ	26
Бабич П. И., Зарубин В. Н. МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ ПУТЕМ РЕСИНХРОНИЗАЦИИ БИОРИТМОВ ОРГАНИЗМА	30
Зыбкина А. В., Иматдинов И. Р., Полежаева О. А., Щербakov Д. Н. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ FC-ИНЖИНИРИНГА	34
Каиржанова А. Д., Камалова Д. К., Шведюк В. Б., Шевцов А. Б. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОДЕЛЕЦИЙ ЛОКУСА AZF Y-ХРОМОСОМЫ В ПОПУЛЯЦИОННОЙ ВЫБОРКЕ КАЗАХСТАНА	37
Карташев А. А., Коев Г. В. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ШТАММОМ <i>STREPTOCOCCUS</i> <i>THERMOPHILUS</i> LB-50	41
Куцербuва Н. С. ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И МПЦР	46
Леонова М. А., Колосов А. Ю., Гетманцева Л. В. ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЛЕЙКЕМИЯ ИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (LIF) С РЕПРОДУКТИВНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СВИНЕЙ	51

**Малышев Б. С., Евдокимов А. А., Сметанникова Н. А.,
Абдурашитов М. А., Акишев А. Г., Кузнецов В. В.,
Давидович Е. С., Федотов В. В., Карпов А. Б.,
Нетесова Н. А., Дегтярев С. Х. GLAD-ПЦР-АНАЛИЗ
ОНКОМАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК,
АССОЦИИРОВАННЫХ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ.....55**

**Милевская Е. А., Чепелева Е. В., Павлова С. В.,
Сергеевичев Д. С., Закиян С. М. МОНИТОРИНГ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАРДИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК КРЫСЫ В ЗОНУ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ
МИОКАРДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ
РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ.....59**

**Мима К. А., Бурмакина Г. С., Титов И. А.,
Малоголовкин А. С. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ P17
И P54 ВИРУСА АЧС В КЛЕТКАХ COS-1 И НЕК-29362**

**Моисеева А. А., Охлопкова О. В., Колосов А. В. ИЗУЧЕНИЕ
СИНЕРГЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
ИНТЕГРИРОВАННОГО БИОИНСЕКТИЦИДА ДЛЯ БОРЬБЫ
С НЕПАРНЫМ ШЕЛКОПРЯДОМ (*LYMANTRIA DISPAR* L.)65**

**Одинцова Е. С., Баранова С. В., Бунева В. Н., Невинский Г. А.
АНТИТЕЛА-ПРОТЕАЗЫ — НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ
МАРКЕРЫ ХАРАКТЕРА ТЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ68**

**Попова Е. Д., Глаголев В. И., Савушкин В. А.,
Овчинников А. И., Джавахия В. В. РАЗРАБОТКА
ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА
АНТИБИОТИКА ЭРЕМОМИЦИНА МЕТОДОМ
ИНДУЦИРОВАННОГО НЕНАПРАВЛЕННОГО
МУТАГЕНЕЗА72**

**Пурвиньш Л. В., Седых С. Е., Стрельникова Н. А.,
Невинский Г. А. УНИВЕРСАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ
ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА
БЕЛКОВОГО И НУКЛЕИНОВОГО СОСТАВА.....**76

**Райзер О. Б., Хапилина О. Н. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ
(*RHODIOLA ROSEA L.*) В КАЗАХСТАНЕ.....**78

**Ревазян А. С., Ермакова Ю. Г., Белоусов В. В. СОЗДАНИЕ
РАЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА
ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ОСНОВЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА NEONOXE**83

**Седых С. Е., Принц В. В., Бунева В. Н., Невинский Г. А.
ОБМЕН НЛ-ФРАГМЕНТАМИ — ПРОЦЕСС,
СТИМУЛИРУЮЩИЙ ПОЯВЛЕНИЕ ПОЛИРЕАКТИВНЫХ
БИСПЕЦИФИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**85

**Сейтбатгалова А. И., Шемшура О. Н., Исмаилова Э. Т.,
Мазунина М. Н., Каптагай Р. Ж. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ
РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *LAMIACEAE LIND.* НА РОСТ
ПРОРОСТКОВ СОИ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ
К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ГРИБНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**86

**Степанов Н. А., Сенько О. В., Ефременко Е. Н.
ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ
ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ПОЛИСАХАРИДОВ**91

**Суббот А. М. Новиков И. А., Нестерова Т. В. Чеботарь И. В.
НОВАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ДЛЯ «СТАРЫХ ПРИБОРОВ» —
ЛАНТАНОИДНОЕ КОНТРАСТИРОВАНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ СЭМ.....**93

Тагиманова Д. С., Сулейменов Р. М. СЕЛЕКЦИЯ ГОРОХА <i>IN VITRO</i> НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ	98
---	-----------

Ткачёва А. В., Коваль О. В., Гражданцева А. А., Сиволобова Г. Ф., Кочнева Г. В., Рихтер В. А. ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГМ-КСФ И ЛАКТАПТИН	101
---	------------

Тутукова С. А., Пономарева Н. В., Митрошина Е. В., Мищенко Т. А., Ведунова М. В., Бабаев А. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ CASE12 И CHR2-VENUS В АСТРОЦИТЫ	106
--	------------

Фадеева Н. П. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ СЛОЖНЫХ СМЕСЕЙ БИОМОЛЕКУЛ НА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОМ И ПОЛУПРОМЫШЛЕННОМ УРОВНЯХ	109
---	------------

Шалаев П. В., Долгушин С. А., Терещенко С. А. НОВЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ РАЗМЕРОВ ЦИЛИНДРИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ) МЕТОДОМ ДЕПОЛЯРИЗОВАННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ЖИДКИХ ДИСПЕРСИЯХ	111
--	------------

Шаньшин Д. В., Иматдинов И. Р., Никонорова Ю. В., Волкова Н. В., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Е ВИРУСА ЗИКА И ЕГО ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ	115
--	------------

**О.Н. Шапрова, Мурашкин Д. Е., Шаньшин Д. В.,
Щербаков Д. Н. ПОИСК ПЕПТИДОВ СПЕЦИФИЧЕСКИ
ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С СТЛА-4..... 119**

**Юнусова А. Ю., Пышная И. А., Чинак О. А. КОНЬЮГАЦИЯ
БЕЛКА ЛАКТАТПТИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА
МОДИФИЦИРУЕТ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
БЕЛКА И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ С КЛЕТКАМИ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MDA-MB-231 122**

**Яринич Л. А., Сильников В. Н. ИССЛЕДОВАНИЕ
ЗАВИСИМОСТИ «СТРОЕНИЕ — АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ» НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ
АММОНИЕВЫХ ОСНОВАНИЙ 127**

РАЗДЕЛ 2

ВИРУСОЛОГИЯ

**Амиргазин А. О., Шевцова Е. С., Карибаев Т. Б., Шевцов А. Б.
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ
ВАКЦИННОГО ШТАММА *B. ABORTUS* 82
И ВОЗМОЖНОСТЬ ЕГО ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
НА ОСНОВЕ MLVA-16 131**

**Ачигечева П. Ю., Унагаева Н. В., Никонорова Ю. В.
ПОЛУЧЕНИЕ АДАПТИРОВАННЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1
К ЛАБОРАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МТ-4 135**

**Баймухаметова А. М., Қалқожаева М. Қ., Лукманова Г. В.,
Глебова Т. И., Кливлеева Н. Г. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ
ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1, ВЫДЕЛЕННЫХ
В АРАЛЬСКОМ РЕГИОНЕ В 2015–2016 ГГ. 139**

Боковая О. В., Морозова В. В., Козлова Ю. Н.
ТЕРМОФИЛЬНЫЙ БАКТЕРИОФАГ AP45: СВОЙСТВА,
АНАЛИЗ ГЕНОМА, ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ 141

**Гудымо А. С., Данильченко Н. В., Марченко В. Ю.,
Гончарова Н. И., Пьянкова О. Г., Сулопаров И. М.,
Мальцев С. В., Таранов О. С., Рыжиков А. Б.** РАЗРАБОТКА
ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКИ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСМИССИВНОСТИ ВИРУСА
ГРИППА С ПАНДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ 144

Кольцов А. Ю., Сальников Н. И., Колбасов Д. В.
ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРЕЦОВ РОДА *CULICOIDES*
НА ТЕРРИТОРИИ СМОЛЕНСКОЙ И КАЛУЖСКОЙ
ОБЛАСТЕЙ..... 148

**Мазурков О. Ю., Кабанов А. С., Скарнович М. О.,
Бормотов Н. И., Скарнович М. А., Серова О. А.,
Шишкина Л. Н., Чернонос А. А.** ОЦЕНКА
ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ПРОТИВООСПЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО
СОЕДИНЕНИЯ НИОХ-14..... 152

**Макаревич Е. В., Скарнович М. О., Горбунова И. А.,
Мазуркова Н. А.** ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ГРИБОВ ГАСТЕРОМИЦЕТОВ
LYCOPERDON PYRIFORME И *PHALLUS IMPUDICUS*
В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А..... 157

Малоголовкин А. С., Бурмакина Г. С., Титов И. А.
МУЛЬТИГЕННЫЕ СЕМЕЙСТВА — ДЕТЕРМИНАТНЫ
ВИДОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ
ЧУМЫ СВИНЕЙ..... 160

**Мальцев С. В., Данильченко Н. В., Гудымо А. В.,
Пьянкова О. Г., Рыжиков А. Б. НОВЫЙ МЕТОД
КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПАНДЕМИЧЕСКОГО
ПОТЕНЦИАЛА ВИРУСА ГРИППА.....** 162

**Овчинникова А. С., Ал. А. Сергеев, Галахова Д. О.,
Титова К. А., Ар. А. Сергеев, Таранов О. С., Л. Е Булычев,
Агафонов А. П., Сергеев А. Н. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООСПЕННЫХ ХИМИЧЕСКИ
СИНТЕЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЫШЕЙ ИНТРАНАЗАЛЬНО
ЗАРАЖЕННЫХ ВОО** 167

**Онгарбаева Н. С., Лукманова Г. В., Сактаганов Н. Т.,
Глебова Т. И., Кливлеева Н. Г. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА СВИНЕЙ А/Н1N1,
ВЫДЕЛЕННЫХ В 2010 И 2012 ГГ. НА ТЕРРИТОРИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН** 172

**Панферова Ю. А., Третьяков К. А., Суворова М. А.
ГЕНОТИПЫ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
НА ТЕРРИТОРИИ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
И САНКТ-ПЕТЕРБУРГА.....** 174

**Петрова П. А., Коновалова Н. И., Даниленко Д. М.,
Щеканова С. М., Васильева А. Д., Желтухина А. И.,
Лобова Т. Г., Еропкин М. Ю. ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ
ГРИППА 2013–2016 ГГ. В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ
СРЕДИ ДЕТЕЙ.....** 177

**Ружкова А. А., Пьянков С. А., Максимов Н. Л., Пьянков О. В.,
Карань Л. А., Агафонов А. П. СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ
ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ
ЛИХОРАДКОЙ ЗИКА** 181

**Сактаганов Н. Т., Қалқожаева М. Қ., Шаменова М. Г.,
Онгарбаева Н. С., Амирашева Л. К., Кливлеева Н. Г.**
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА А
В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ
СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА В 2014–2016 ГГ.....** 186

**Святченко С. В., Дурыманов А. Г., Сулопаров И. М.,
Колосова Н. П., Гончарова Н. И., Марченко В. Ю.,
Шиповалов А. В., Епанчинцева А. В., Петрова О. В.,
Рыжиков А. Б., Ильичева Т. Н. ХАРАКТЕРИСТИКА
ШТАММОВ ВИРУСОВ ГРИППА А И В,
ЦИРКУЛИРОВАВШИХ СРЕДИ ЛЮДЕЙ
НА ТЕРРИТОРИИ РФ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ
2015–2016.....** 188

**Титова К. А., Ал.А. Сергеев, Кабанов А. С., Булычев Л. Е.,
Сергеев Ар. А., Галахова Д. О., Овчинникова А. С.,
Шишкина Л. Н., Таранов О. С., Агафонов А. П.,
Сергеев А. Н. ЛАБОРАТОРНАЯ МОДЕЛЬ НА ОСНОВЕ
ИММУНОДЕФИЦИТНОЙ МЫШИ ЛИНИИ SCID
ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ
ОТ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ** 194

**Филиппова Е. И., Лобанова И. Е., Высочина Г. И.,
Мазурков О. Ю., Мазуркова Н. А. ПРОТИВОВИРУСНЫЕ
СВОЙСТВА РАСТЕНИЙ ЮГО-ЗАПАДНОЙ СИБИРИ** 199

**Чаусов Е. В., Плясунова И. В., Протопопова Е. В.,
Карташов М. Ю., Семенцова А. О., Терновой В. А.,
Сергеева Е. И., Шиков А. Н., Берилло С. А., Демина О. К.,
Локтев В. Б., Агафонов А. П. ЗАВОЗНЫЕ СЛУЧАИ
ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....** 201

Шкаликова М. В., Бурмакина Г. С., Мима К. А., Титов И. А., Малоголовкин А. С. РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ.....	204
--	------------

РАЗДЕЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Ашба А. М., Акимов М. Г., Грецкая Н. М., Безуглов В. В. N-АЦИЛДОФАМИНЫ ИНДУЦИРУЮТ АПОПТОЗ В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ РС12 ЧЕРЕЗ НЕКЛАССИЧЕСКИЙ КАННАБИНОИДНЫЙ РЕЦЕПТОР HE-SB1-HE-SB2.....	208
---	------------

Бауэр Т. В., Трегубчак Т. В., Максютлов Р. А., Щелкунов С. Н. РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С УВЕЛИЧЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРИОНОВ.....	212
--	------------

Болотова Т. А., Тарасенко В. И., Константинов Ю. М., Кулинченко М. В. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ АРАБИДОПСИСА В ИМПОРТЕ ДНК	215
---	------------

Бондарь А. А., Курищиков А. М., Морозкин Е. С., Зарипов М. М., Кабилов М. Р., Войццкий В. Е., Власов В. В., Лактионов П. П. ПОИСК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ДНК КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	221
---	------------

Буркова Е. Е., Невинский Г. А. МОРФОЛОГИЯ И ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЕЗИКУЛ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА	224
--	------------

**Григорьева А. Е., Еремина А. В., Тамкович С. Н.,
Брызгунова О. Е. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ЭКЗОСОМ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ КРОВИ, МОЧИ И СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЛЮДЕЙ
МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ
ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЙ.....**226

**Дерюшева И. В., Цыганов М. М., Родионов Е. О.,
Ибрагимова М. К., Миллер С. В., Литвяков Н. В.
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ МОНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
У БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**231

**Дольский А. А., Пустыльник В. О., Ярушкин А. А.,
Лемская Н. А., Юдкин Д. В. ИНГИБИТОРЫ ДЕАЦЕТИЛАЗ
ГИСТОНОВ ЯВЛЯЮТСЯ СЛАБЫМИ АКТИВАТОРАМИ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНА FMR1 В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК
ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ
Х-ХРОМОСОМЫ**236

**Жуков И. Ю., Гурьев Е. Л., Копылов А. Т., Мезенцев Ю. В.,
Чернорудский А. Л., Згода В. Г., Иванов А. С., Гайнуллин М. Р.
ВЛИЯНИЕ ГЛИКИРОВАНИЯ МЕТИЛГЛИОКСАЛЕМ
НА СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА
УБИКВИТИН-КОНЪЮГИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА UBE2N**238

**Зыкова А. А., Куприянов В. В. КОНСТРУИРОВАНИЕ
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ М2Е ПЕПТИДА
ВИРУСА ГРИППА, ОБРАЗУЮЩИХ НАНОРАЗМЕРНЫЕ
ЧАСТИЦЫ.....**243

Ибрагимова М. К., Цыганов М. М., Казанцева П. В., Вернадский Р. Ю., Слонимская Е. М., Чердынцева Н. В., Литвяков Н. В. КЛОНАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ И ГЕМАТОГЕННОЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ	247
--	------------

Иванкин А. В., Болдырева Л. В., Кожевникова Е. Н., Пиндюрин А. В. ВЛИЯНИЕ НАРУШЕНИЯ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА НА УРОВЕНЬ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	252
---	------------

Карташов М. Ю., Микрюкова Т. П., Терновой В. А., Москвитина Н. С., В.Б. Локтев ИЗУЧЕНИЕ ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ КЛЕЩАМИ D. RETICULATUS В ГОРОДЕ ТОМСКЕ	257
---	------------

Ковнер А. В., Максимова Г. А. РОЛЬ EMT И ENDOMT В ФИБРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ ПРИ ОПИСТОРХОЗЕ <i>OPISTHORCHIS FELINEUS</i>	262
--	------------

Лебедев М. О., Яринич Л. А., Пиндюрин А. В. СОЗДАНИЕ ШТРИХКОДИРОВАННЫХ БИБЛИОТЕК РЕПОРТЕРНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	267
--	------------

Невская К. В., Иванов В. В., Кривошеков С. В., Майнагашева Е. С. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АДЕНОЗИНА В ОБЛАСТИ ОЖОГОВОЙ РАНЫ	271
--	------------

**Новаковская А. П., Туржанова А. С., Хапилина О. Н.,
Календар Р. Н. ОЦЕНКА ВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА
БОБОВЫХ ТРАВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-МЕТОДОВ274**

**Пирожкова Д. С. ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS* ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ХОЗЯИНА АНТИГЕЛЬМИНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ
ПРАЗИКВАНТЕЛ.....278**

**Рак А. Я., Трофимов А. В., Петров А. В., Ищенко А. М.
СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА
ГОРМОНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АГЕНТА283**

**Рудомётов А. П., Андреева Н. Б., Бакулина А. Ю.,
Щербаков Д. Н. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОГЕНОВ
ПРОТИВ ВИЧ-1, ВКЛЮЧАЮЩИХ ЭПИТОПЫ
ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ МРЕР ВИЧ-1286**

**Суслова Е. А., Сибрикова Д. С., Прошкина Г. М., Деев С. М.
РАЗРАБОТКА НОВОГО АГЕНТА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ
DARPIN_MCHERRY_RE40 НА ОСНОВЕ БЕЛКА
С АНКИРИНОВЫМИ ПОВТОРАМИ290**

**Хаджиева М. Б., Зимина О. А. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ
ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК
И РИСК РАЗВИТИЯ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ
БЕРЕМЕННОСТИ294**

**Цыганов М. М., Дерюшева И. В., Ибрагимова М. К.,
Литвяков Н. В. ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ
ПОЛИМОРФИЗМОВ С ИЗМЕНЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ.....297**

**Черникова Д. С., Горчаков А. А., Кулемзин С. В., Баранов К. О.,
Волкова О. Ю., Таранин А. В. СОЗДАНИЕ СЕНСОРНОЙ
В-КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ПОВЕРХНОСТНОЙ
ЭКСПРЕССИЕЙ ЗАРОДЫШЕВОЙ ФОРМЫ ВИЧ-
СПЕЦИФИЧНОГО ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО
АНТИТЕЛА VRC01303**

**Чернорудский А. Л. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ УБИКВИТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ
БЕЛКОВ TRAP150 И BCLAF1306**

**Ширшикова Т. В., Хиляс И. В., Матросова Л. Е.,
Шарипова М. Р., Богомольная Л. М. РОЛЬ ЭФФЛЮКС
СИСТЕМЫ MACAB *SERRATIA MARCESCENS*
В СЕКРЕЦИИ ГЕМОЛИЗИНОВ И ПРОТЕАЗ309**

Научное издание

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

Сборник тезисов

Верстка А. С. Терешкиной

Подписано в печать 15.09.2016 г.
Формат 60 × 84 1/16. Уч.-изд. л. 20,5. Усл. печ. л. 19.
Тираж 170 экз. Заказ № 202.
Редакционно-издательский центр НГУ
630090, Новосибирск-90, ул. Пирогова, 2.

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

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



ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ



**НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
БИОЛОГОВ, ВИРУСОЛОГОВ И БИОТЕХНОЛОГОВ**



**ЭКСПОЗИЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
КОМПАНИЙ**



**НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ: ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА
МИКРОМИРА**



ISBN 978-5-4437-0563-7



9 785443 705637

www.openbio.ru