OPEN BIO

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

VIII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

БИОФИЗИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

В РАМКАХ ПЛОЩАДКИ ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО, 2021

ФБУН ГНЦ ВБ "ВЕКТОР"

ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР КОЛЬЦОВО

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО

БИОТЕХНОПАРК КОЛЬЦОВО

БИОФАРМ

НОВОСИБИРСКИЙ ОБЛАСТНОЙ ФОНД ИННОВАЦИОННЫЙ

VIII МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ: БИОФИЗИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2021

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

М431 VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2021: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2021. — 424 с.

ISBN 978-5-4437-1237-6

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной научно-практической конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов и биофизиков, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2021.

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

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

ISBN 978-5-4437-1237-6
© АНО «Инновационный центр Кольцово», 2021

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

I

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ РАВНОВЕСНОЙ КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА «ДНК-ПОЛИМЕРАЗА — ОЛИГОНУКЛЕОТИД» ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОДНОВАЛЕНТНОЙ И ДВУХВАЛЕНТНОЙ СОЛЕЙ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИМЕРАЗ

М. О. Архипов

АО «Вектор-Бест», Новосибирск
Новосибирский государственный университет

E-mail: m.arkhipov@g.nsu.ru

Аннотация
В данной работе представлены результаты исследования зависимости сродства ДНК-полимеразы к олигонуклеотидному субстрату от концентрации солей для некоторых ДНК-полимераз, принадлежащих разным эволюционным семействам.

ДНК-полимеразы играют ключевую роль в реализации такого биотехнологического метода, как полимеразная цепная реакция (ПЦР), который, в свою очередь, является основой качественного и количественного анализа специфических последовательностей нуклеиновых кислот во многих научных и практических областях. Многообразие сфер применения данного метода требует ДНК-полимеразы с различными свойствами. Помимо этого, создание как можно более полной математической модели, учитывающей влияние солей, кофакторов и температуры на различные стадии ПЦР, позволит существенно упростить многие рутинные процедуры при решении различных практических задач, связанных с использованием технологии ПЦР.

Но для сравнения различных ДНК-полимераз, а также для математического моделирования ПЦР требуется информация о том, как ключевые параметры полимеразного синтеза, включая сродство ДНК-полимеразы к ДНК-субстрату, зависят от концентрации одновалентной и двухвалентной солей. Поэтому целью данной работы являлось исследование зависимости равновесной константы диссоциации (Kd) комплекса ДНК-полимераза-олигонуклеотид от концентрации KCl и $MgCl_2$ для некоторых полимераз, принадлежащих разным эволюционным семействам.

Все Kd получали путем измерения анизотропии флуоресценции на микропланшетном флуориметре TECAN Safire II с использованием программного обеспечения XFluor4. В работе использовались 5 различных ДНК-полимераз, являющихся представителями эволюционных семейств A, B и RT ДНК-полимераз. В качестве ДНК-субстрата в экспериментах использовался флуоресцентно меченный олигонуклеотид со вторичной структурой типа «шпилька».

Было показано, что все экспериментально полученные зависимости Kd от концентраций KCl и $MgCl_2$ для всех полимераз на качественном уровне хорошо согласуются с теоретической зависимостью Kd от концентрации одновалентной соли, построенной на основе теории конденсации противоионов. В опубликованной ранее работе [1], посвященной исследованию зависимости Kd от концентрации KCl и $MgCl_2$ для Taq-полимеразы, а также фрагмента Стоффеля, оценивалось количество ионов, высвобождающихся при связывании фермента с субстратом, по линейному участку зависимости Kd от концентрации соответствующей соли в двойных логарифмических координатах. Авторами приводились количества высвобождающихся ионов, совпадающие со значениями, полученными в текущей работе при анализе на аналогичном диапазоне изменения концентраций солей. Однако

© М. О. Архипов, 2021

в опубликованной работе исследовался весьма узкий диапазон концентраций солей. В текущем исследовании диапазон концентраций был расширен и было показано, что количество высвобождающихся ионов уже больше при более высоких концентрациях солей.

Таким образом, были установлены закономерности в изменении сродства различных ДНК-полимераз к олигонуклеотидному субстрату при изменении концентрации KCl и $MgCl_2$. Помимо этого, в дальнейшем важно понять, за счет каких кинетических констант происходят наблюдаемые изменения Kd с ростом концентрации соли, а также выполнить исследование зависимости каталитической константы скорости полимеризации от концентрации солей. Указанные закономерности могут быть использованы для математического моделирования ПЦР с использованием различных ДНК-полимераз в разных солевых условиях.

Литература

1. Datta K., LiCata V. J. Salt Dependence of DNA binding by Thermus aquaticus and Escherichia coli DNA Polymerases // Journal of Biological Chemistry. 2003. Vol. 278. № 8. P. 5694–5701.

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ СУБТИЛИЗИНОВ НА ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАБОТЫ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА

Г. И. Байкалов [1,2], К. И. Бахарева [1],
Р. А. Князев [2], К. И. Ершов [2], П. Г. Мадонов [1,2]

[1] ФГБНУ НИИКЭЛ — филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[2] Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

E-mail: gbaikalov@yandex.ru

Аннотация

Иммобилизированный субтилизин — это биотехнологически созданный фибринолитический фермент, иммобилизированный с помощью электронно- лучевого синтеза. Иммобилзированный субтилизин (ИмСубт) обладает прямым фибринолитическим действием и является тромболитическим препаратом. В настоящий момент его влияние на работу сердца не изучено. Оптимальным решением для изучения влияния ИмСубт на интегральные показатели работы сердца подходит модель изолированного сердца млекопитающего по Лангендорфу. В качестве интегральных показателей работы сердца были выбраны: «работоспособность» — произведение давления на частоту сокращений в минуту — и «работоспособность/коронарный поток» — параметр, отражающий эффективность работы сердца.

Эксперименты проведены на 50 крысах-самцах линии Вистар массой 280–320 г. Все эксперименты проведены по методу Лангендорфа. Животные были разделены на 5 групп: 1-я группа — «Контроль» (сердца, перфузируемые только раствором Кребса — Хензеляйта) и 4 опытных группы. 1-я опытная группа — перфузия ИмСубт в концентрации 170 ед/л; 2-я опытная группа — перфузия ИмСубт в концентрации 340 ед/л; 3-я опытная группа — перфузия ИмСубт в концентрации 510 ед/л; 4-я опытная группа — перфузия ИмСубт в концентрации 1020 ед/л.

Показатель «работоспособность». В группе «Контроль» отмечали нарастание показателя «работоспособность» с 5-й по 20-ю минуту (от 2 до 6 %), а далее наблюдалось плавное снижение до 5 % от исходного. В опытной группе № 1 отмечали достоверное увеличение показателя «работоспособность» с 5-й по 20-ю минуту перфузии на 9–11 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Контроль», но далее наблюдалось снижение данного показателя до 8 % от исходного. В опытной группе № 2 отмечали, что с 5-й по 40-ю минуту перфузии показатель «работоспособность» достоверно увеличивался ($p < 0,05$), достигая своего максимума на 20 минуте перфузии (прирост на 21 %) по сравнению с группой «Контроль». В опытной группе № 3 отмечали увеличение показателя «работоспособность» с 5-й по 10-ю минуту на 11–16 % ($p < 0,05$), а далее наблюдали снижение данного показателя с 20-й по 40-ю минуту перфузии на 8 % относительно группы «Контроль». В опытной группе № 4 отмечали постепенное увеличение показателя «работоспособность» с 5-й по 40-ю минуту на 10–17 % ($p < 0,05$) относительно группы «Контроль». Максимальное увеличение показателя «работоспособность» было отмечено на 30 минуте перфузии.

Показатель «работоспособность/коронарный поток». В группе «Контроль» отмечали снижение показателя «работоспособность/коронарный поток» с 5-й по 20-ю минуту (от 1 до 5 %), а далее наблюдалось плавное увеличение до 3 % от исходного. В опытной группе № 1 отмечали снижение показателя «работоспособность/коронарный поток» к 40 минуте перфузии на 5 % по сравнению с группой «Контроль». В опытной группе № 2 отмечали снижение показателя «работоспособность/коронарный поток» к 30 минуте перфузии на 3 % по сравнению с группой «Контроль». В опытной группе № 3 отмечали первичное увеличение показателя «работоспособность/коронарный поток» к 5-й минуте на 6 % ($p > 0,05$), а далее наблюдали достоверное увеличение данного показателя с 10 по 40 минуту перфузии на 26–29 % ($p < 0,05$) относительно группы «Контроль». В опытной группе № 4 отмечали увеличение показателя «работоспособность/коронарный поток» с 5-ю по 40-ю минуту на 16–39 % ($p < 0,05$) относительно группы «Контроль». Максимальное увеличение данного показателя было отмечено на 30-й минуте перфузии.

Установлено, что иммобилизированные субтилизины позитивно влияют на показатели работоспособности миокарда.

© Г. И. Байкалов, К. И. Бахарева, Р. А. Князев, К. И. Ершов, П. Г. Мадонов, 2021

МОДИФИКАЦИЯ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МАРКИРОВАНИЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ IDH1 И TP53*

И. Н. Бакланов, Н. В. Гончаров, В. В. Кумейко, В. С. Гулая

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

E-mail: baklanov.in@students.dvfu.ru

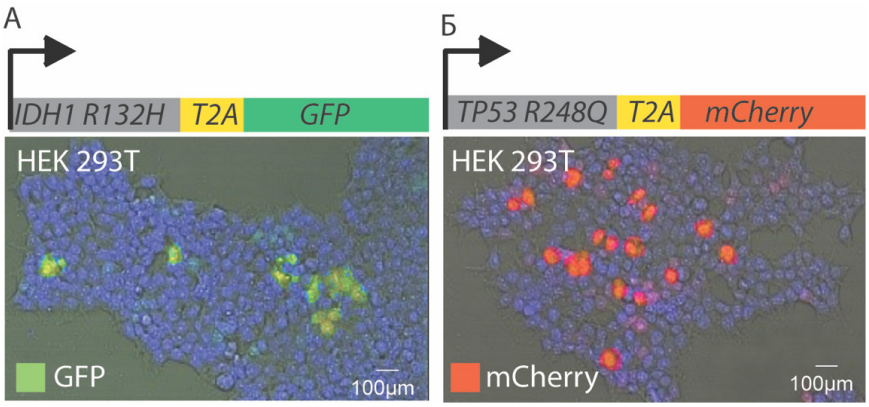
Аннотация

Опухоли головного мозга — это одно из самых опасных онкологических заболеваний, характеризующееся высокой смертностью пациентов ввиду особенности локализации опухоли и частого инвазивного роста [1, 5]. Большая часть новообразований ЦНС происходит из злокачественных опухолей, расположенных за пределами центральной нервной системы, из-за их способности метастазировать. Наиболее распространенными типами первичных опухолей головного мозга являются глиомы и менингиомы [2, 6]. Несмотря на их распространенность, а также установленные гистологические и молекулярные характеристики в соответствии с классификацией ВОЗ 2016 года, до сих пор остается малоизученным влияние ключевых генов и онкоассоциированных вариантов IDH1 и TP53 на молекулярный профиль клеток глиом.

Точечные мутации в гене *IDH1* часто встречаются в глиомах, при этом некоторые онкогенные варианты *IDH1* являются одним из залогов успешной химиотерапии темозоломидом и благоприятного исхода для пациентов [3]. К данным вариантам относится мутация, приводящая к замене аргинина на гистидин в положении 132 первичной аминокислотной последовательности (R132H) [4, 6]. В то же время мутантный вариант гена *TP53* R248Q чаще ассоциирован с низкой выживаемостью пациентов, но каких-либо точных утверждений о ее роли в глиомах нет [5]. Несмотря на то что данные мутации довольно часты и оказывают глубокое влияние на экспрессию других регуляторных генов, эта мутационная комбинация еще никогда не изучалась.

Целью данной работы является модификация лентивирусных векторов для флуоресцентного маркирования гиперэкспрессии мутантных вариантов генов *IDH1 R132H* и *TP53* R248Q в клеточных линиях глиом.

Для этого мы разработали генетическую конструкцию с системой флуоресцентной индикации мутантных аллелей, которая будет использоваться при сборке лентивирусных частиц. Данная система позволяет гиперэкспрессировать гены *IDH1* и *TP53* в клетках и маркировать фолдинг белков с помощью флуоресцентных репортеров. Встраивание 2A пептидов между интересующими генами и флуоресцентными маркерами способствует их экспрессии в эквивалентном соотношении под контролем одного промотора (см. рисунок) [7, 8]. Таким образом, уровень флуоресценции соответствует уровню экспрессии мутантных белков.



Фотографии HEK293T после трансфекции
модифицированными лентивирусными векторами:
А — IDH1 R132H (eGFP); *Б* — TP53 R248Q (mCherry)

Результаты

В рамках данной работы были получены модифицированные лентивирусные векторы и проведена оценка их работоспособности в клеточной линии HEK293T. На снимках с конфокального микроскопа (см. рисунок) видно,

© И. Н. Бакланов, Н. В. Гончаров, В. В. Кумейко, В. С. Гулая, 2021

* Исследование финансировалось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0657-2020-0004 и гранта РНФ № 20-15-00378.

что клеточная линия HEK293T, подвергнутая трансдукции вирусными частицами, имеет ярко выраженную флуоресценцию eGFP (*А*) и mCherry (*Б*), что подтверждает правильность сборки конструкций.

Разработанный подход с использованием флуоресцентных репортеров в связке с исследуемыми генами через последовательность T2A позволяет оценить уровень экспрессии исследуемого гена с помощью флуоресцентного микроскопа, так как и репортер, и исследуемый ген будут экспрессироваться в эквивалентном соотношении под контролем одного промотора. Данный метод позволяет провести селекцию клеток для дальнейших исследований, не прибегая к дополнительным методам окраски или селекции антибиотиками.

Литература

Ohgaki H., Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas // Acta Neuropathol. 2005. Vol. 109. № 1. P. 93–108.

Zong H., Parada L. F., Baker S. J. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. Vol. 7. № 5. P. 1–13.

Hegi M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. № 10. P. 997–1003.

Zanotto-Filho A. et al. Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas // Cancer Lett. 2015. Vol. 358. № 2. P. 220–231.

Jiang Y., Uhrbom L. On the origin of glioma // Ups. J. Med. Sci. 2012. Vol. 117. № 2. P. 113–121.

Louis D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // Acta Neuropathol. 2016. Vol. 131. № 6. P. 803–820.

Liu Z. et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. № 1. P. 2193.

Wang Y. et al. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm Bombyx mori. // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 16273.

ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИНФОРМАЦИОННЫХ РНК *

И. А. Бахно [1,2], И. С. Довыденко [1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: i.bakhno@g.nsu.ru

Аннотация

Данная работа направлена на получение 5'-модифицированной конструкции информационной РНК (иРНК). В ходе работы был проведен дизайн конструкции иРНК, на основе которого были получены ДНК-матрица для синтеза иРНК методом *in vitro* Т7-транскрипции. Также был проведен синтез флуоресцентных модификаторов, которые были использованы для направленной модификации иРНК.

Информационные РНК находят применение в молекулярной биологии, биотехнологии и медицине. Используемые иРНК часто содержат химические модификации, обеспечивающие устойчивость иРНК или наличие новых свойств. Введение модификаций в состав иРНК на данный момент возможно с помощью рибонуклеотид трифосфатов, однако такой способ обеспечивает случайное встраивание модификации, и в случае введения объемных заместителей может приводить к снижению эффективности или отсутствию трансляции.

Целью работы являлся синтез новых 5'-модифицированных иРНК. Для направленного введения модификации на 5'-конец иРНК мы адаптировали методику введения синтетического кэпа. В качестве модификаторов нами были выбраны ди- и мононуклеотиды, содержащие в своем составе флуоресцентную метку тетраметилродамин (TAMRA). Флуорофор TAMRA является достаточно объемной модификацией, вследствие чего его встраивание в иРНК будет означать, что и другие аналогичные по объему заместители можно вводить в состав иРНК методом *in vitro* Т7-транскрипции (IVT) с использованием модифицированных ди- и мононуклеотидов.

Для реализации поставленной цели была собрана ДНК-матрица для IVT и клонирована в вектор pUC19. Матрица содержала кодирующую eGFP-последовательность, обрамленную 5′- и 3′-нетранслируемыми областями (НТО), а также на 3′-конце содержала поли-А-хвост. Участок внутренней посадки рибосомы был введен в 5′-НТО для обеспечения инициации трансляции ввиду замены кэп-структуры на химическую модификацию. Также нами были получены TAMRA-содержащие модификаторы: 5′-TAMRA-G-3′, 5′-G-TAMRA-G-3′, 5′-TAMRA-GG-3′. Синтез модификаторов проводили твердофазным амидофосфитным методом, после чего продукты выделяли хроматографически. Далее проводили оптимизацию протокола встраивания.

В ходе работы было установлено, что максимальное встраивание происходит в случае расположения флуорофорной группы на конце динуклеотида, с меньшей эффективностью происходит встраивание, когда краситель расположен между нуклеотидами, а в случае мононуклеотида встраивание почти не происходит.

© И. А. Бахно, И. С. Довыденко, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№ 19-15-00217) и финансировании ГЗ (№ 0245-2019-0002).

ИССЛЕДОВАНИЕ КОГНИТИВНОГО ПРОФИЛЯ DANIO RERIO ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЛАТФОРМЫ ПО СКРИНИНГУ НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ *IN VIVO*

А. А. Баширзаде [1,2], А. С. Белова [1,2], Сохейл Азизи [1],
В. Я. Бабченко [1,2], В. О. Мыров [3]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск*
[3] *ZebraML, Inc., Houston, TX, USA*

E-mail: alim.bashirzade95@mail.ru

Аннотация

Рассматривается использование модельного организма Danio rerio в качестве инструмента для скрининга потенциальных лекарственных средств. Формирование когнитивного профиля зебраданио позволит тестировать нейротропные лекарства существенно быстрее и эффективнее.

Выход нового лекарственного препарата (ЛС) на рынок занимает около 10–12 лет, а затраты оцениваются среднем в 1 млрд долларов. Но несмотря на огромные расходы, большинство исследований становятся провальными. Только 13 % лекарств, вступивших в фазу I клинических исследований, доходят до стадии регистрации. От многих нейродегенеративных заболеваний до сих пор не существует эффективного лечения. Для решения данной проблемы мы предлагаем создать сервис по тестированию потенциальных ЛС на модельном организме Danio rerio. Модель имеет ряд биологических преимуществ, что позволяет проводить высокопроизводительный скрининг малых молекул *in vivo*: она неприхотлива и требует относительно низких затрат на содержание, имеет короткий цикл онтогенеза, развитие эмбрионов происходит *ex utero*, имеет полностью секвенированный геном, 70 % генов ортологичны генам человека, фармакологические мишени на 90 % совпадают с мишенями человека.

В ходе работы на рыбах под действием нейротоксина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) в дозе 50 и 100 мг/кг удалось получить снижение пройденного расстояния и средней и максимальной скорости в тесте нового аквариума, а в дозе 200 мг/кг — снижение пространственной рабочей памяти в виде снижения процента спонтанных альтераций в тесте «Y-образный лабиринт». Данные поведенческих экспериментов были согласованы с результатами дифференциальной кластеризации контрольных и обработанных групп при анализе поведения с помощью искусственного интеллекта. Результаты данных исследований позволяют предложить рыб зебраданио в качестве модели для тестирования потенциальных противопаркинсонических лекарств.

Использование различных апробированных когнитивных тестов и скрининговые биологические преимущества зебраданио увеличивают эффективность разработок исследуемых потенциальных ЛС. Благодаря методам иммуногистохимии, анализа экспрессии генов-мишеней, биохимическим анализам белков-мишеней, на базе НИИ нейронаук и медицины создана платформа для тестирования нейротропных ЛС *in vivo*.

© А. А. Баширзаде, А. С. Белова, Сохейл Азизи, В. Я. Бабченко, В. О. Мыров, 2021

ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ ВАКЦИНОЙ «КОМБИКОРОНАВАК» ПРИВОДИТ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ СИЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2*

М. Б. Боргоякова [1,2], Л. И. Карпенко [1,2], Д. Н. Щербаков [1,2], А. П. Рудомётов [1,2], Е. В. Старостина [1,2], Д. В. Шаньшин [1], А. А. Исаева [1,2], В. С. Несмеянова [1,2], Н. В. Волкова [1], С. В. Беленькая [1], Е. А. Волосникова [1,2], А. М. Задорожный [1], Л. А. Орлова [1], А. В. Зайковская [1], О. В. Пьянков [1], А. А. Ильичёв [1]

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

E-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru

Аннотация

Были созданы уникальные вакцинные конструкции, представляющие собой вирусоподобные частицы, содержащие ДНК-плазмиды, кодирующие антигены вируса SARS-CoV-2, в качестве ядра и белок RBD на поверхности. Иммунизация мышей данными вакцинами вызвала формирование высоких титров S- и RBD-специфичных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью. Также было показано, что у мышей в результате иммунизации формируется специфический Т-клеточный ответ.

Несмотря на то что в настоящее время уже создан и используется для массовой вакцинации ряд вакцин против SARS-CoV-2, работы по разработке эффективных, безопасных, технологичных и доступных вакцин продолжаются. При разработке новой кандидатной вакцины «КомбиКоронаВак» мы использовали оригинальную платформу, основная идея которой заключается в объединении в одной частице двух протективных вирусных иммуногенов: один в виде белка и другой в виде нуклеиновой кислоты (ДНК-вакцинной конструкции).

«КомбиКоронаВак» представляет собой вирусоподобные частицы, которые в качестве ядра содержат плазмиды pVAX-S и pVAX-RBD, кодирующие полноразмерный белок S и его рецепторсвязывающий домен (RBD) соответственно. На поверхности данных частиц находится белок RBD, конъюгированный с комплексом «полиглюкин-спермидин», обеспечивающим инкапсуляцию ДНК.

Для проверки иммуногенности данных вакцин мыши BALB/c были иммунизированы внутримышечно дважды с интервалом три недели, одна вакцинная доза содержала 100 мкг плазмидной ДНК и 50 мкг белка. Анализ сывороток мышей показал, что введение комбинированных вакцин приводит к формированию выраженного гуморального ответа против SARS-CoV-2. Титры антител в ИФА против S- и RBD-белков составили в среднем более 1 : 100 000, титры в тесте вирус-нейтрализации — от 1 : 100 до 1 : 500. Кроме того, с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов были зарегистрированы CD4+- и CD8+-клетки, секретирующие IFN-γ и IL-2 в ответ на стимуляцию пептидами из белка S, что свидетельствует о формировании специфического клеточного ответа. Эти результаты показывают, что введение вакцины «КомбиКоронаВак», сочетающей ДНК- и белковый компоненты, обеспечивает сильный иммунный ответ и указывают на необходимость дальнейших исследований безопасности и протективности данных вакцин.

© М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко, Д. Н. Щербаков, А. П. Рудомётов, Е. В. Старостина, Д. В. Шаньшин, А. А. Исаева, В. С. Несмеянова, Н. В. Волкова, С. В. Беленькая, Е. А. Волосникова, А. М. Задорожный, Л. А. Орлова, А. В. Зайковская, О. В. Пьянков, А. А. Ильичёв, 2021

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

ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ МАРКЕРОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО КНИ-БИОСЕНСОРА *

А. Е. Булгакова [1], Е. В. Дмитриенко [1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

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

Аннотация

Разработан электрохимический КНИ-биосенсор для выявления нуклеотидных маркеров. Исследованы незаряженные аналоги НК в качестве специфических зондов, продемонстрировано специфичное выявление НК-маркеров, соответствующих 20 молекулам аналита в образце. Апробированы протоколы пробоподготовки аналита с использованием магнитных наночастиц оксида железа и полимерной мембраны на основе нейлона-6.

Выявление нуклеиновых кислот (НК) — актуальная и перспективная область современных исследований в биотехнологии при разработке диагностикумов. В настоящее время наиболее перспективным типом биосенсоров можно считать сенсоры на основе электрохимического преобразователя, благодаря их тщательно разработанному протоколу изготовления, высокому отношению сигнал/шум, возможности количественно анализировать небольшие объемы образцов и реакции в реальном времени. Принцип работы биосенсора строится на способности образования высокоспецифичного комплекса между анализируемой НК, находящейся в исследуемом биологическом образце, и зондом, иммобилизованным на поверхности сенсора. Электрохимические биосенсоры преобразуют сигнал от связывания с аналитом в детектируемый электрический сигнал, пропорциональный концентрации мишени.

Применение электрохимических биосенсоров в наши дни очень широко: для анализа контаминации продуктов питания, в качестве устройства для ухода за больными, контроля окружающей среды и для обнаружения биологически значимых молекул. Также НК-биосенсоры используются в качестве быстрых, эффективных и недорогих датчиков для диагностики бактериальных и вирусных инфекций, мониторинга различных генетических заболеваний и типов опухолей, а также для обнаружения патогенных микроорганизмов, что особенно важно для мест оказания медицинской помощи.

Наиболее перспективными среди электрохимических биосенсоров можно считать биосенсоры на основе полевых транзисторов. При этом одним из распространенных материалов для изготовления полевых транзисторов считается кремний, ввиду простоты, дешевизны и усовершенствованных технологий изготовления кремния в электронной промышленности. В данной работе в качестве современного высокочувствительного диагностикума был использован микропроволочный транзистор со структурой «кремний на изоляторе» — КНИ-биосенсор. Чувствительность и эффективность анализа на КНИ-биосенсоре при выявлении нуклеотидных маркеров зависит от заряда на поверхности сенсора и может достигать аттомолярного уровня. В рамках данной работы на синтетических модельных системах исследована возможность выявления таких нуклеотидных маркеров, как мРНК белка тропонина, ассоциированного с инфарктом миокарда, а также протяженной, структурированной 18S рРНК человека с помощью КНИ-биосенсора. В ходе работы был проведен сравнительный анализ эффективности гетерофазной гибридизации нативных олигонуклеотидов и незаряженных производных НК — фосфорилгуанидиновых аналогов олигонуклеотидов (ФГО) в качестве специфических зондов, иммобилизованных на поверхность сенсора. В рамках предложенных модельных систем продемонстрирована возможность образования специфичного гибридизационного комплекса. Апробированы протоколы пробоподготовки аналита с использованием магнитных наночастиц оксида железа и полимерной мембраны на основе нейлона-6, при этом высвобождение аналита с поверхности сорбента составляет более 85 %. Показана высокая чувствительность разработанного подхода, которая составила ~20 молекул аналита в образце, что демонстрирует перспективы КНИ-биосенсора в экспресс-диагностике.

© А. Е. Булгакова, Е. В. Дмитриенко, 2021

* Работа выполнена при поддержке базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1 и РНФ 21-64-00017.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НЕЙТРОФИЛАМИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ НАНОПРЕПАРАТОВ *

Д. А. Вишневский [1,2], А. С. Гаранина [3], В. А. Науменко [2], А. А. Чернышева [2], А. Н. Шкарина [3], Ю. А. Малиновская [4], А. С. Семкина [1,2], М. А. Абакумов [1,3]

[1] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского Минздрава России, Москва*
[3] *Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва*
[4] *Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва*

E-mail: logannaridenna@gmail.com

Аннотация

Проблема увеличения эффективности доставки лекарственных нанопрепаратов в опухоль до сих пор является крайне актуальной для наномедицины. Один из способов решения этой проблемы — использование клеточных носителей, способных доставлять нанопрепараты. Наиболее перспективными носителями могут быть нейтрофилы (НФ) периферической крови из-за их высокой численности и способности мигрировать на большие расстояния в организме. Также НФ могут преодолевать сосудистый барьер и направляться в опухоль в ответ на продуцируемые ею хемокины. Однако успех использования НФ во многом зависит от степени их взаимодействия с нанопрепаратами. Несмотря на большое количество работ по данному направлению, молекулярные механизмы захвата наночастиц (НЧ), а также их влияние на НФ и роль НФ в доставке определенных НЧ к опухоли остаются малоизученными.

В данной работе исследовались три типа НЧ (липосомы, магнитные и ПЛГА НЧ), отличающиеся по физико-химическим параметрам, чтобы оценить их влияние на взаимодействие с НФ. НФ были получены из периферической крови мышей с привитой опухолью аденокарциномы молочной железы 4T1. Анализ накопления НЧ в НФ *in vitro* показал, что все три типа НЧ захватываются клетками. При исследовании внутриклеточной локализации НЧ было выявлено, что через час инкубации НЧ находятся вне ранних или поздних эндосом, но имеют различное расположение внутри клетки. Липосомы накапливаются в везикулах меньших, чем эндосомы, или сходных с ними размеров, магнитные НЧ находятся в органеллах большего размера, а ПГЛА визуализируются в виде скоплений в фагосомах. Изучение механизмов эндоцитоза НЧ с помощью различных ингибиторов показало, что захват зависит от клатрин-опосредованного эндоцитоза, холестерина клеточной мембраны и полимеризации актина. Визуализация накопления НЧ при ингибировании эндоцитоза показала различия в их локализации: ПЛГА оставались на мембране НФ, а липосомы не визуализировались на/в НФ. Таким образом, для исследуемых НЧ существуют различные начальные точки взаимодействия с НФ, а механизмы захвата НЧ зависят от общих молекулярных и биохимических процессов.

Для оценки влияния НЧ на НФ была исследована экспрессия CD11b и продукция активных форм кислорода (АФК) НФ. Было выявлено, что взаимодействие всех типов НЧ с НФ приводит к несущественному увеличению экспрессии CD11b и продукции АФК НФ, что говорит об отсутствии активации НФ.

С помощью интравитальной микроскопии было показано, что НФ не захватывают липосомы после внутривенного введения мышам, однако экстравазация данных клеток инициирует накопление НЧ в опухоли посредством двух паттернов — микро- и макроутечек, ассоциированных с НФ. Роль НФ в доставке липосом в опухоль была подтверждена также с помощью деплеции Ly6G, которая привела к снижению накопления НЧ в опухоли. В свою очередь магнитные НЧ выходили из кровеносных сосудов благодаря спонтанным утечкам и захватывались различными клетками микроокружения опухоли, включая моноциты и НФ. ПЛГА накапливались по периферии сосудов в виде локальных скоплений.

Таким образом, взаимодействие НФ с НЧ зависит от физико-химических параметров последних в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Дальнейшее более детальное изучение механизмов взаимодействия НЧ с НФ позволит определить наиболее подходящие параметры НЧ для увеличения эффективности доставки лекарственных препаратов в опухоль.

© Д. А. Вишневский, А. С. Гаранина, В. А. Науменко, А. А. Чернышева, А. Н. Шкарина, Ю. А. Малиновская, А. С. Семкина, М. А. Абакумов, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (грант № 21-74-20077).

МИКРОЧАСТИЦЫ С КОМБИНИРОВАННЫМ АНТИСЕПТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ НА ОСНОВЕ ПГА-ПОЛИМЕРА ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ*

А. В. Владимирова, Е. И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет, Красноярск

E-mail: aleksa-vladimirova@yandex.ru

Аннотация

Одним из приоритетных направлений развития современной медицины и фармакологии является создание новых высокоэффективных лекарственных систем. Биополимерные микрочастицы, содержащие противомикробные, противовоспалительные и регенерирующие соединения, могут ускорить процесс эндогенного заживления повреждений кожи.

Разработка систем пролонгированной доставки лекарств является перспективным и быстро развивающимся направлением. Депонирование лекарственного средства в полимерной системе, например, в микросферах, рассматривается как один из наиболее распространенных способов доставки. Широкая универсальность таких систем связана с характеристиками, которые можно смоделировать для конкретного применения, а именно: состав частиц, размер и форма, наличие пористости или включение биологически активных агентов (системы с двойным профилем высвобождения, включение остеокондуктивных материалов, цитокинов, факторов роста). Применимость полимерных систем на основе микрочастиц для тканевой инженерии кожных покровов и подлежащих мягких тканей обусловлена эффективностью заполнения зон тканевых дефектов даже при пространных повреждениях.

Для создания микросферических систем пролонгированной доставки препаратов рассматривается множество полимеров. Поли-3-гидроксибутират (П(3ГБ)) относится к среднецепочечным полигидроксиалканоатам (ПГА), которые являются хорошими кандидатами для разработки систем доставки лекарств и различных тканеинженерных конструкций, поскольку они обладают всеми необходимыми свойствами.

В качестве обязательного условия успешной регенерации мягких тканей выступает отсутствие инфекции. Актуальные антисептики позволяют успешно контролировать бактериальную нагрузку, но они также могут вызывать местную цитотоксичность в высоких концентрациях, а также иссушение раны, что снижает скорость ее заживления. Депонирование антисептиков в биодеградируемые микрочастицы позволит избежать побочных эффектов без потери эффективности препарата.

Для создания системы пролонгированной доставки антисептических составов в форме микрочастиц был использован поли(3-гидроксибутират) с молекулярной массой 1200 кДа. В качестве веществ, проявляющих бактериостатические свойства, были выбраны антисептики «Бриллиантовый зеленый» и «Протаргол».

Были определены следующие физико-химические характеристики: размерное распределение, электрокинетический потенциал, выход микрочастиц, эффективность депонирования, возможная цитотоксичность. Эффективность депонирования бриллиантового зеленого составила до 95 %. Средний размер частиц составил от 40 до 60 ± 1,2 мкм, что является подходящим размером для применения при поверхностных повреждениях кожи, дзета-потенциал — от –20 ± 0,70 мВ до –35 ± 0,95 мВ. Модификация поверхности частиц протеинатом серебра приводит к изменению дзета-потенциала с –25,2 до 16, 8 мВ. Это позволяет предположить, что микрочастицы с ковалентно пришитым протеинатом серебра могут взаимодействовать с отрицательно заряженными компонентами внешней плазматической мембраны. При исследовании потенциальной цитотоксичности было отмечено более мягкое действие сконструированной системы доставки на фибробласты по сравнению со свободными препаратами, имевшими явный цитотоксический эффект. В присутствии микрочастиц с протеинатом серебра выживаемость фибробластов была выше на 20 % по сравнению с системой без модификаций.

© А. В. Владимирова, Е. И. Шишацкая, 2021

* Исследования выполнены при поддержке Фонда содействия инновациям (договор 16050ГУ/2020 от 24.12.2020).

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ НЕСООТВЕТСТВИЯ, НА НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА*

Е. А. Горбунова[1,2], *А. В. Епанчинцева*[2], *И. А. Пышная*[2]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

E-mail: gorbunova-ekaterina@inbox.ru

Аннотация

Известно, что сродство одноцепочечной (оц) ДНК к наночастицам золота (НЧЗ) выше, чем двухцепочечной (дц) ДНК. Механизмы адсорбции дцДНК на НЧЗ описаны в литературе скупо. Проведено изучение закономерностей нековалентной адсорбции ДНК-дуплексов различной топологии на поверхность НЧЗ. Нативная дцДНК с нависанием TTGTTG адсорбируется на НЧЗ быстрее, чем тупоконечная дцДНК. Показано, что флуоресцеин в составе ДНК служит «якорем» и сглаживает эти различия.

Дизайн носителей, содержащих нуклеиновые кислоты (НК) — одна из фундаментальных и практических задач биоорганической химии для прикладной биомедицины. НЧЗ — перспективный носитель НК благодаря способности к прочной нековалентной адсорбции НК на поверхности НЧЗ. Ранее нами была изучена нековалентная адсорбция оцДНК на НЧЗ при низкой ионной силе [1].

Цель работы — изучение закономерностей нековалентного взаимодействия сферических НЧЗ и ДНК-дуплексов, содержащих комплементарные несоответствия (или оц-«нависания» разной нуклеотидной последовательности и длины), в условиях низкой ионной силы. Термодинамические и кинетические параметры адсорбции ДНК на НЧЗ исследовали по данным интенсивности флуоресценции, радиометрии и методом гель-электрофореза. «Нависания» располагались топологически с одной стороны дуплекса: с 5'-, 3'- или 5'/3'-концов ДНК-цепей. Дуплексы состояли из FAM-меченных и нативных 20-звенных ДНК. «Нависания» состояли из одного (L), двух (2L) или четырех (4L) TTTTTT- или TTGTTG-мотивов, отличающихся сродством к НЧЗ. Показано, что температуры термической денатурации (T_m) ДНК-дуплексов с длинными нависаниями (2L, 4L) меньше в сравнении с T_m нативного тупоконечного дуплекса на 6 и 8 °C. Мы не выявили значимой разницы в эффективности адсорбции тупоконечного и «нависающего» дуплексов на поверхность НЧЗ при 25 °C в течение 22 часов в 4,0 мМ растворе цитрата натрия. Для нативных ДНК значения константы Лэнгмюра выросли ~ в 2 раза по сравнению с FAM-содержащими ДНК, а покрытие уменьшилось в 2 раза. Эффективность адсорбции ДНК-дуплексов на НЧЗ была ~ в 2 раза ниже, чем оцДНК, входящих в их состав. Нативный дуплекс ДНК с одним нависанием имеет более быструю кинетику адсорбции на НЧЗ по сравнению с тупоконечным, что может указывать на разные модели связывания НЧЗ и дуплексов ДНК различной топологией. Увеличение температуры инкубации ДНК и НЧЗ увеличивает плотность покрытия НЧЗ дуплексами ДНК.

Литература

1. Epanchintseva A., Vorobjev P., Pyshnyi D. et al. Fast and Strong Adsorption of Native Oligonucleotides on Citrate-Coated Gold Nanoparticles // Langmuir. 2018. Vol. 34. № 1. P. 164–172.

© Е. А. Горбунова, А. В. Епанчинцева, И. А. Пышная, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках проекта № 19-44-543012\19 и базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1.

СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ КАК ОСНОВА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКОВ*

Е. В. Григорьева, Е. В. Дмитриенко

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

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

Аннотация

Создание новых средств направленной лекарственной терапии на основе наночастиц является одним из перспективных направлений в тераностике, которая включает в себя терапию и диагностику.

Были получены и исследованы наноматериалы на основе оксида железа Fe_3O_4 и транспортного белка — альбумина человека, выполнено покрытие магнитных наночастиц человеческим альбумином, а также исследовано взаимодействие с противоопухолевым препаратом доксорубицином.

В последние десятилетия наноматериалы активно используют при разработке адресной системы доставки лекарственных препаратов; согласно литературным данным, наиболее популярными являются магнитные и белковые наночастицы. Использование таких наночастиц при конструировании систем доставки лекарственных средств пролонгируют действие введенного лекарственного препарата, защищает лекарственные вещества от деградации и клетки организма от токсического действия вводимых препаратов. Основными преимуществами магнитных наночастиц в качестве основы систем доставки лекарственных средств является возможность их визуализации магнитной резонансной томографией (МРТ), бесконтактное управление их перемещениями за счет внешнего магнитного поля, а также термолабильность в магнитном поле. В свою очередь, нанообъектные биополимеры также обладают наименьшей по сравнению с другими классами наночастиц токсичностью, так как являются белковыми компонентами плазмы крови, а также имеют малый период полувыведения вследствие способности к биодеградации. Иммобилизация на поверхности наноразмерных объектов лекарственных веществ, направляющих агентов и сигнальные молекулы, позволит совместить терапию и диагностику в рамках концепции тераностики.

В данной работе предлагается получение и стабилизация суперпарамагнитных наночастиц магнетита Fe_3O_4 и наночастиц на основе альбумина для дальнейших биомедицинских применений. Магнитные наночастицы получали методом химического осаждения из водных растворов соответствующих солей металлов. Стоит отметить, что магнитные наночастицы склонны к агрегированию без каких-либо дополнительных покрытий, поэтому в ходе синтеза использовали олеиновую кислоту и ряд детергентов, таких как Tween-20 и цетилтриметиламмония бромид (CTAB), а также ковалентное и нековалентное формирование белковой оболочки из сывороточного альбумина для достижения коллоидной стабильности частиц и снижения их токсичности. Гидродинамический диаметр полученных магнитных наночастиц составил около 150 нм при индексе полидисперсности (ИПД) 0,2. Также на основе человеческого сывороточного альбумина были синтезированы наночастицы размером около 130 нм с индексом полидисперсности 0,09. Исследовано взаимодействие наночастиц магнетита с человеческим сыворотоным альбумином (ЧСА) в условиях ковалентного взаимодействия в присутствии перекиси водорода и нековалентной сорбции. Выявлено, что транспортный белок стабилизирует поверхность наночастиц, предохраняя их от агрегации в водной среде.

Для всех типов полученных наночастиц исследована эффективность взаимодействия с модельным лекарственным препаратом — доксорубицином. Определена емкость исследуемых типов наноматериалов, проведена оценка токсичности магнитных наночастиц *in vitro* и показана pH-зависимая эффективность высвобождения препарата. Показана коллоидная устойчивость наночастиц в фетальной бычьей сыворотке при температуре 37 °C в течение как минимум 7 дней.

Полученные белковые и магнитные наночастицы могут быть исследованы в дальнейшей работе для диагностики и лечения онкологических заболеваний.

© Е. В. Григорьева, Е. В. Дмитриенко, 2021

* Работа выполнена при поддержке базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1 и РНФ 21-64-00017.

ОКСИФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ КАК ИСТОЧНИКИ АНТИОКСИДАНТОВ И НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ*

М. Е. Дмитриева, Е. В. Переляева, М. М. Моргунова, А. Ю. Белышенко, Т. Ю. Тельнова, Н. А. Имидоева, Д. В. Аксёнов-Грибанов

Иркутский государственный университет

E-mail: marrieekrasnova@gmail.com

Аннотация

Окислительный стресс (ОС) признается важнейшей причиной, способствующей развитию дегенеративных процессов. Природные соединения с антиоксидантной активностью способны вступать во взаимодействие со свободными радикалами. Таким образом, антиоксиданты блокируют развитие свободно радикального окисления и могут участвовать в профилактике и лечении нейродегенеративных заболеваний (НДЗ). Мы предполагаем, что микроорганизмы озера Байкал синтезируют природные соединения с антиоксидантной активностью, поскольку сталкиваются с условиями природной гипероксии.

Выявление факторов, способствующих НДЗ, является одной из наиболее важных задач современной медицины. Необходимость лечения НДЗ — неотложная задача, поскольку ВОЗ прогнозирует, что через 20 лет НДЗ будут превалировать над смертностью от раковых опухолей и станут второй по распространенности причиной смерти [1]. Интерес для поисковых исследований представляют микроорганизмы древних экосистем. Одна из таких систем — озеро Байкал, которое характеризуется низкой концентрацией минеральных солей, температурой воды и высокой степенью насыщенности воды кислородом. Такие условия позволили микроорганизмам сформировать защитные механизмы к повышенному содержанию кислорода и агрессивному окислительному фону окружающей среды.

Целью исследования выступала оценка антиоксидантного потенциала микроорганизмов озера Байкал, культивированных в условиях повышенного оксидативного фона. Микроорганизмы культивировали в нескольких условиях: в условиях естественной аэрации (контроль), в условиях повышенного содержания кислорода, а также в условиях совместного повышенного содержания кислорода и озона. Для оценки антиоксидантной активности использовали спектрофотометрический метод с реагентом DPPH (Sigma). Оценку состава природных соединений проводили при помощи подходов хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и использования базы данных Dictionary of natural Products (DNP, CRC press, V.2018).

Обнаружено, что штамм *Streptomyces* IB2019M2C-2 синтезирует соединение с молекулярной массой 600,3486 Да, идентифицированное как Nocardamine. Согласно DNP, Nocardamine (Desferrioxamin E) является антиоксидантом и сидерофором. Другое природное соединение с массой 599,2496 Да было идентифицировано как Ferrioxamine A2. Синтез данного метаболита отмечали исключительно в экспериментальных условиях. Согласно DNP, оно является переносчиком железа. Поскольку железо способствует образованию АФК, в медицине используются различные хелаторы железа. В исследовании J. Lan (1997) [2] показано, что десферриоксамин значительно снижает уровень железа в головном мозге на мышиных моделях болезни Паркинсона. В нашем исследовании синтез таких соединений, как Nocardamine (Desferrioxamin E), Ferrioxamine A2, был индуцирован созданными условиями ОС, что может подтверждать их участие в нейропротекции.

Литература

1. Duraes F. et al. Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases // Pharmaceuticals (Basel). 2018. Vol. 11, № 2. P. 44.

2. Lan J., Jiang D. Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice // J. Neural Transm. 1997. Vol. 104. P. 469–481.

© М. Е. Дмитриева, Е. В. Переляева, М. М. Моргунова, А. Ю. Белышенко, Т. Ю. Тельнова, Н. А. Имидоева, Д. В. Аксёнов-Грибанов, 2021

* Исследование проведено при частичной финансовой поддержке гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4) и гранта РФФИ 18-29-05051.

РАЗРАБОТКА КОНЪЮГАТОВ АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* С УЛУЧШЕННЫМИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ

Н. В. Добрякова [1], Д. Д. Жданов [2], Н. Н. Соколов [2], Е. В. Кудряшова [1]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва*

E-mail: natdobryak@gmail.com

Аннотация

Получены ковалентные конъюгаты L-аспарагиназы с сополимерами хитозан-ПЭГ, хитозан-гликоль и хитозан-ПЭИ и определена их противоопухолевая активность на клетках хронической миеломной лейкемии человека К-562.

Для лечения некоторых видов лейкозов, в частности острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), применяют бактериальные аспарагиназы. Основной механизм действия L-аспарагиназ заключается в способности гидролизовать аминокислоту L-аспарагин до L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Таким образом, при использовании препарата L-аспарагиназы концентрация L-аспарагина в крови снижается. Более чувствительные к недостатку данной аминокислоты раковые клетки перестают синтезировать ДНК, РНК и белки и гибнут.

На практике успешно применяют L-аспарагиназы *Esherichia coli* (EcA) и *Erwinia carotovora* (EwA). Однако данные ферменты могут вызывать различные побочные эффекты, связанные с нейро- и гепатотоксичностью, нарушением свертывания крови. Поэтому актуальной задачей является поиск ферментов из других источников с более подходящими свойствами. L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* (RrA), в отличие от коммерческих препаратов, обладает сниженной глутаминазной активностью, более короткой аминокислотной последовательностью (172 аминокислотных остатка) и низкой гомологией с препаратами EcA и EwA. Однако pH-оптимум RrA лежит в районе pH 9–9,5, что может сказываться на ее каталитической активности при физиологических условиях. Также фермент может подвергаться деградации в кровотоке под действием протеолитических ферментов. В нашей лаборатории ведется разработка методов конъюгирования L-аспарагиназ с различными полимерами для улучшения их свойств [1]. Предполагается, что использование ионных сополимеров, таких как ПЭГ-хитозан, гепарансульфат, полиэтиленимин (ПЭИ) и др. позволит регулировать каталитические свойства RrA, что будет способствовать увеличению ее цитотоксичности и устойчивости к биодеградации.

Для оптимизации состава конъюгатов по отношению к каталитическим параметрам и стабильности RrA в работе были получены полиэлектролитные комплексы (ПЭК) со следующими полимерами: хитозан-ПЭГ, ПЭИ-ПЭГ, ПЭИ, гепарин, хитозан, хитозан-гликоль. Измерение активности гидролиза L-аспарагина данными ПЭК показало наибольший прирост активности у комплекса RrA с ПЭИ (примерно на 30 %). Также для RrA-ПЭИ наблюдалось увеличение стабильности к трипсинолизу. При инкубации с трипсином при 37 °C в течение 1 ч сохранялось около 60 % от начальной активности фермента. Нативный фермент сохранял менее 20 % активности в таких условиях. В работе был синтезирован конъюгат RrA с сополимером хитозан-ПЭГ по реакции восстановительного аминирования. У конъюгата повышалась каталитическая активность и устойчивость к трипсинолизу. Для дальнейшей оптимизации каталитических свойств и цитотоксичности осуществлен синтез конъюгатов RrA с хитозан-ПЭИ, хитозан-ПЭГ, хитозан-гликоль. Для данных конъюгатов определена цитотоксическая активность в сравнении с нативным ферментом на клетках хронической миеломной лейкемии человека К-562. Противоопухолевая активность у RrA и ее конъюгатов была выше, чем для коммерчески доступных препаратов L-аспарагиназ из EcA и EwA.

Литература

1. Sukhoverkov K. V., Sokolov N., Abakumova O. et al. The formation of conjugates with PEG–chitosan improves the biocatalytic efficiency and antitumor activity of L-asparaginase from Erwinia carotovora // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71, № 2. P. 122–126.

© Н. В. Добрякова, Д. Д. Жданов, Н. Н. Соколов, Е. В. Кудряшова, 2021

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ОКСИДАЗ ГРИБА *THIELAVIA OVISPORA*, СПОСОБНЫЕ ДЕГРАДИРОВАТЬ ПРОМЫШЛЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ*

А. Д. Егорова, А. М. Черных, Ж. В. Ренфельд, М. П. Коломыцева

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

E-mail: anneteshebanova@mail.ru

Аннотация

Красители активно используются в текстильной, бумажной, пищевой промышленностях, в производстве пластика и для нужд бактериологии, микроскопии и ветеринарии. Многие красители являются опасными загрязнителями окружающей среды, негативно влияющими на здоровье человека и животных. На сегодняшний день известно множество физико-химических методов деградации красителей, но все они сопряжены с высокими эксплуатационными затратами и наносят серьезный ущерб окружающей среде. Поэтому поиск экологически чистых способов деградации красителей становится все более востребованным в биоремедиации сточных вод и почв, утилизации промышленных отходов. В качестве решения проблемы предлагаются новые оксидазы аскомицета *T. ovispora*, способные эффективно разлагать широкий спектр промышленных красителей без использования дорогостоящих медиаторов.

Известным промышленно ценным ферментом, окисляющим широкий спектр ароматических субстратов, является лакказа (КФ 1.10.3.2, *n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, «голубая» оксидаза) [1, 2]. Будучи внеклеточным ферментом, лакказа более толерантна к внешним условиям среды по сравнению с внутриклеточными ферментами, с чем связано удобство ее применения в промышленных процессах, протекающих в нефизиологических условиях [3]. Однако большинство известных грибных и бактериальных лакказ способно окислять промышленные красители только в присутствии в реакционной среде медиаторов, значительно повышающих стоимость процесса и увеличивающих риски попадания загрязнителей в окружающую среду.

Используемый в настоящей работе гриб *T. ovispora* неприхотлив в культивировании, способен проявлять оксидазную активность на ранних этапах культивирования без добавления специфических лакказных индукторов в присутствии природных источников углерода и энергии. Гриб продуцирует оксидазы, активные в отношении ряда промышленных красителей без использования медиаторов, что дает преимущество для их использования в биотехнологиях. Были исследованы различные препараты с оксидазной активностью на способность к деградации малахитового зеленого в почве и водных системах: мицелий гриба *T. ovispora*, его культуральная жидкость, а также препараты чистой оксидазы. Продемонстрирована деколоризующая активность всех препаратов в отношении малахитового зеленого (до 125 мг/л) в ходе инкубирования (6–48 часов), что соответствует мировым аналогам и в некоторых случаях превосходит их. Так, использование чистой оксидазы гриба в модельных условиях позволило осуществить полное разложение малахитового зеленого в жидкой среде за 6 часов инкубирования без использования медиаторов. Показана способность оксидаз гриба к деградации широкого спектра других промышленных красителей. Получена полная нуклеотидная последовательность гена лакказы гриба *T. ovispora* и проведен ее филогенетический анализ в сравнении с известными генами лакказ аско- и базидиомицетов.

Литература

1. Baldrian P. Fungal laccases–occurrence and properties // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Vol. 30. P. 215–242.

2. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis // Process Biochem. 2012. Vol. 47. P. 1295–1307.

3. Shraddha, Shekher R., Sehgal S. et al. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // Enz. Res. 2011. 217861.

© А. Д. Егорова, А. М. Черных, Ж. В. Ренфельд, М. П. Коломыцева, 2021

* Работа была поддержана Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках работы по проекту «УМНИК-2019» (договор № 15500ГУ/2020 (номер 0059365)).

ВЛИЯНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК НА АФФИННОСТЬ ДНК К НАНОЧАСТИЦАМ ЗОЛОТА *

А. В. Епанчинцева, И. А. Пышная, Д. В. Пышный

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: annaepanch@gmail.com

Аннотация

Впервые проведено систематическое исследование влияния структуры флуорофоров в составе ДНК на эффективность образования нековалентных ассоциатов с наночастицами золота (НЧЗ). В работе исследовали ДНК различной длины и состава, а также их флуоресцентные производные, изученные флуорофоры относились к ряду полиметиновых, ксантеновых или полициклических ароматических красителей. Показано, что введение любого из изученных флуорофоров в молекулу ДНК увеличивает эффективность покрытия молекулами ДНК поверхности НЧЗ в 3–11 раз.

Развитие биотехнологического кластера на территории Новосибирской области требует разработки современных высокотехнологичных средств тераностики (терапии и диагностики): сенсоров для широкого круга биологически значимых мишеней и систем внутриклеточной доставки терапевтических нуклеиновых кислот (НК). НЧЗ являются перспективными носителями НК благодаря своим спектральным характеристикам, нетоксичности, устойчивости при хранении, простому способу синтеза. Для количественной оценки степени адсорбции НК обычно используют флуоресцентные метки. Однако сами флуорофоры способны к нековалентному взаимодействию с НЧЗ, искажая, таким образом, истинную количественную величину связывания нативной НК с НЧЗ. Цель данной работы — исследование влияния флуорофоров, относящихся к полиметиновым, ксантеновым или полициклическим ароматическим красителям, в составе ДНК на ее адсорбцию на НЧЗ.

Методами флуориметрии и радиометрии, обращенно-фазовой ВЭЖХ и гель-электрофореза показано, что введение любого из изученных флуорофоров в молекулу НК кардинально влияет на эффективность покрытия молекулами НК поверхности НЧЗ. Поверхностная плотность НЧЗ флуоресцентно меченными ДНК увеличилась в 3–11 раз по сравнению с нативными ДНК и достигла 189 молекул на каждую НЧЗ.

Установлено, что поверхностная плотность ассоциатов, гидрофобность ДНК, заряд флуорофоров, общий заряд молекулы ДНК и площадь поверхности флуорофора — это ключевые факторы, определяющие аффинность нативной или флуоресцентно меченной ДНК к НЧЗ. Эти факторы образуют специфический набор, позволяющий предсказывать с высокой надежностью эффективность связывания ДНК с НЧЗ. Создан алгоритм для оценки эффективности взаимодействия нативных и флуоресцентно меченных ДНК с НЧЗ. Впервые предложена гипотетическая модель, описывающая механизм контактного взаимодействия между отрицательно заряженными нанообъектами, такими как стабилизированные ионами цитрата НЧЗ и ДНК, в том числе флуоресцентно мечеными [1].

Литература

1. Epanchintseva A. V., Gorbunova E. A., Ryabchikova E. I. et al. Effect of Fluorescent Labels on DNA Affinity for Gold Nanoparticles // Nanomaterials. 2021. Vol. 11. P. 1178. doi: 10.3390/nano11051178.

© А. В. Епанчинцева, И. А. Пышная, Д. В. Пышный, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках gроекта № 19-44-543012\19 и базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1.

ОЦЕНКА АНТИМУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ *

А. И. Ерошин, И. И. Идиятов, А. М. Тремасова

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

E-mail: erosartur@yandex.ru

Аннотация

Консорциум пробиотических молочно- и пропионовокислых бактерий при включении в рацион лабораторных животных на фоне воздействия мутагена снижает частоту выявления клеток костного мозга с хромосомными аберрациями. Таким образом, антимутагенную и антигенотоксическую активности данных микроорганизмов возможно рассматривать в качестве функциональных свойств для их характеристики.

Общедоказана польза для организма от применения ферментированных микроорганизмами продуктов питания и кормов, продуктов, обогащенных пробиотиками. Пробиотические микроорганизмы обладают высокой метаболической активностью, в том числе способны к биосинтезу веществ, участвующих в детоксикации токсикантов, мутагенов, канцерогенов и проявляющих иммуностимулирующие действие, что, в свою очередь, может оказывать воздействие на частоту спонтанных и индуцированных мутаций. При возрастающем со стороны исследователей интересе к пробиотическим бактериям, данных касательно их антимутагенной активности сравнительно немного. В связи с этим целью работы явилось исследование антимутагенного потенциала пробиотических молочно- и пропионовокислых бактерий в составе консорциума.

В экспериментах использовали консорциум изолятов пробиотических бактерий *Streptococcus salivarius, Lactiplantibacillus plantarum, Propionibacterium freudenreichii, Lactococcus lactis*. Антимутагенные свойства консорциума выявляли в тесте на индукцию хромосомных повреждений *in vivo* в клетках костного мозга в опыте на лабораторных крысах линии *Wistar*. В качестве индуктора мутагенеза применяли циклофосфамид — непрямой алкилирующий мутаген с выраженным иммуносупрессивным действием.

При анализе препаратов костного мозга крыс после однократного воздействия мутагена доля клеток с хромосомными нарушениями статистически значимо превышала контрольные значения на 54,20 %; аберраций типа «одиночные фрагменты» было больше контроля на 36,60 %; ахроматические пробелы регистрировались чаще на 4,40 %; клетки с множественными нарушениями отмечены на уровне 4,60 %. Установлено, что у животных, рационы которых обогащены пробиотическими микроорганизмами, процент клеток с хромосомными повреждениями был достоверно ниже, причем прослеживалась определенная закономерность, связанная с концентрацией бактерий и продолжительностью приема пробиотика. Антимутагенный эффект от применения консорциума с титром 1×10^9 КОЕ/мл в течение 7 суток составил 42,70 %, в течение 28 суток — 56,41 %, а при концентрации микробных клеток 1×10^{11} КОЕ/мл — 52,55 и 68,13 % соответственно.

Таким образом, консорциум пробиотических бактерий, сочетающий изоляты *Streptococcus salivarius, Lactiplantibacillus plantarum, Propionibacterium freudenreichii, Lactococcus lactis*, при включении в рацион лабораторных животных и воздействии на них мутагенов способствует снижению частоты выявления клеток с хромосомными аберрациями. При этом отмечена тенденция к усилению эффекта при удлинении срока приема и повышении титра консорциума изолятов. Полученные результаты дают основание полагать, что исследуемый консорциум обладает антимутагенным действием, которое возможно рассматривать как функциональное свойство.

© А. И. Ерошин, И. И. Идиятов, А. М. Тремасова, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта МК-1582.2020.11 (соглашение № 075-15-2020-225 от 27.04.2020).

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ TP53 R248Q И IDH1 R132H В ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ГЛИОМ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9*

В. М. Жменя, Н. В. Гончаров, В. С. Гулая, М. Е. Шмелев,
Н. А. Швед, А. О. Пенькова, И. Н. Бакланов, В. В. Кумейко

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

E-mail: zhmenia.vm@dvfu.ru

Аннотация

Глиомы представляют собой первичные опухоли, развивающиеся из паренхимы мозга. Они составляют около 30 % всех опухолей головного мозга и центральной нервной системы и 80 % всех злокачественных опухолей головного мозга. В глиомах чаще всего происходят мутации в генах TP53 (33,24 %) и IDH1 (24,05 %), совместное влияние мутаций на опухолевый рост не изучено. В данной работе представлена оптимизация метода редактирования генов TP53 и IDH1 с помощью технологии CRISPR/Cas9 в первичных опухолевых клетках глиом.

Глиома — это опухоль головного или спинного мозга, которая развивается из глиальных клеток нервной системы. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) классифицирует глиомы от I до IV, причем IV является наиболее агрессивной и инфильтративной глиомой, называемой мультиформной глиобластомой. Глиомы составляют около 30 % всех опухолей головного мозга и центральной нервной системы и 80 % всех злокачественных опухолей головного мозга [1]. По данным My cancer genome в глиомах чаще всего происходят мутации в генах TP53 (33,24 %) и IDH1 (24,05 %) [2].

IDH1 — ген изоцитратдегидрогеназы, он катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата до альфа-кетоглутарата и играет важную роль в восстановлении НАДФ+ до НАДФН, являясь ключевым ферментом в цикле Кребса. В последние годы было обнаружено, что мутации IDH1 тесно связаны с возникновением и развитием глиом и являются потенциальной терапевтической мишенью. При этом считается, что мутация в гене IDH1 R132H говорит о благоприятном прогнозе для больного и успешном использование химиотерапии [3]. TP53 является основным опухолевым супрессором, который выборочно устраняет поврежденные или мутирующие клетки, снижает пролиферацию раковых клеток и предотвращает трансформацию нормальных клеток в раковые [4]. Выявлено что 64 % всех опухолей с мутацией IDH1 так же несут мутацию TP53 [5], при комбинации этих двух мутаций выживаемость пациентов выше, чем по отдельности. Обнаружено, что онкогенные мутанты IDH1 R132H/R132Q надежно ингибируют экспрессию немутантного p53. Главную роль в ингибировании играет 2-гидроксиглутарат, он стабилизирует индуцируемый гипоксией фактор-2a (HIF2a), который, в свою очередь, активирует экспрессию miR-380-5p, характерную микроРНК, подавляющую экспрессию p53. При ингибировании p53 увеличивается пролиферация и устойчивость к аппотозу в опухолевых клетках [6]. Однако до сих пор не изучено, ингибирует ли мутантный IDH1 мутантный p53.

Целью данной работы является оптимизация протокола трансфекции клеток векторами CRISPR/Cas9 для внесения мутации TP53 R248Q и IDH1 R132H в первичные клеточные культуры глиом для дальнейшей оценки их совместного действия. Вне-

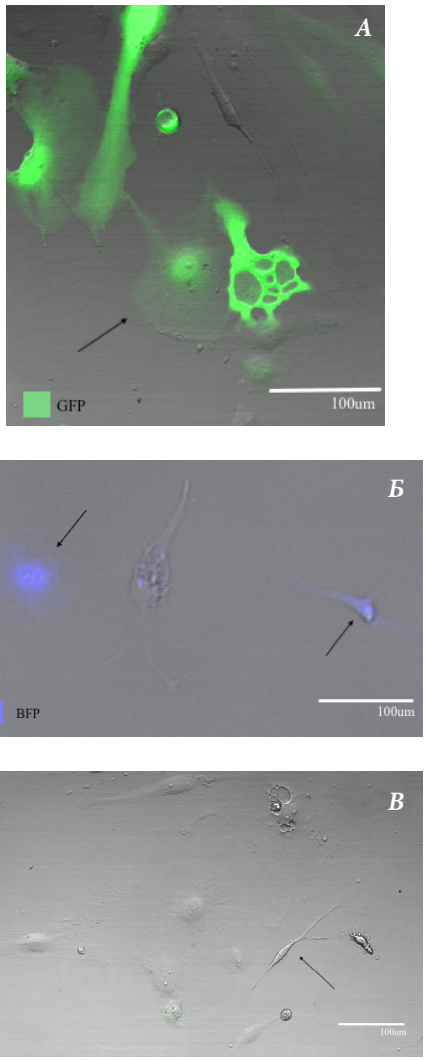


Рис. 1. Контрольные векторы первичной клеточной линии глиом: *А* — положительный контроль, конструкция tDNA-eGFP-mODC, содержащая GFP; *Б* — положительный контроль, конструкция pEF_BFP, содержащая BFP; *В* — отрицательный контроль

© В. М. Жменя, Н. В. Гончаров, В. С. Гулая, М. Е. Шмелев, Н. А. Швед, А. О. Пенькова, И. Н. Бакланов, В. В. Кумейко, 2021

* Исследование финансировалось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0657-2020-0004 и гранта РНФ № 20-15-00378.

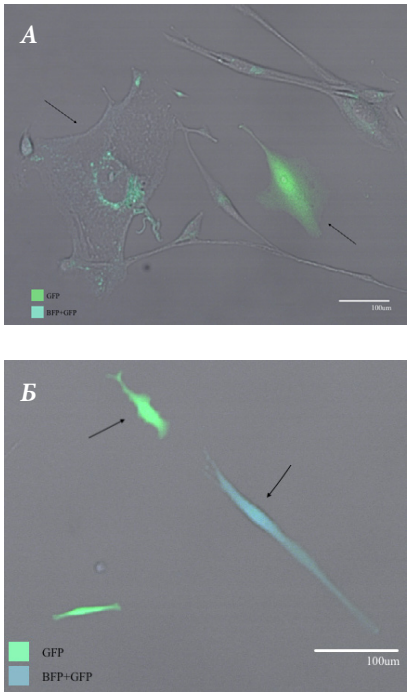


Рис. 2. Визуализация доставки генетических конструкций CRISPR/Cas9 на первичной клеточной линии глиом. *А* — pBT375 + pEF_BFP+ pDT_sgRNA TP53 R248Q; *Б* — pEF_ancBE4max + pEF_BFP+ pDT_sgRNA IDH1 R132H

сение однонуклеотидных замен с помощью классического CRISPR/Cas9 низкоэффективно, поэтому в данной работе применяется наиболее эффективный метод однонуклеотидного редактирования — дезаминирование цитозина с помощью цитидиновой дезаминазы, позволяющий вносить замены C на T вне зависимости от пролиферативной активности клеток с использованием двойной гайд-РНК, содержащей BFP (blue fluorescent protein) [7]. В результате был оптимизирован протокол трансфекции и получены первичные клеточные линии глиом с внесенной генетической конструкций (рис. 1, 2).

Литература

1. Louis D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // Acta Neuropathol. 2016. Vol. 131. № 6. P. 803–820.

2. My cancer genome. URL: https://www.mycancergenome.org/content/disease/glioma/.

3. Geisbrecht B. V., Gould S. J. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 43. P. 30527–30533.

4. Matlashewski G., Lamb P., Pim D., Peacock J., Crawford L., Benchimol S. Isolation and characterization of a human TP53 cDNA clone: expression of the human TP53 gene // The EMBO Journal. 1984. Vol. 3(13). P. 3257–3262.

5. Parsons D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme // Science. 2008. Vol. 321, № 5897. P. 1807–1812.

6. Jiang B. et al. IDH1 Arg-132 mutant promotes tumor formation through down-regulating p53. // J. Biol. Chem. 2018. Vol. 293, № 25. P. 9747–9758.

7. Brookhouser N. et al. BIG-TREE: base-edited isogenic hPSC line generation using a transient reporter for editing enrichment //Stem cell reports. 2020. Vol. 14. № 2. P. 184–191.

PANIMAN: ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АННОТАЦИИ ГЕНОМОВ ЖИВОТНЫХ

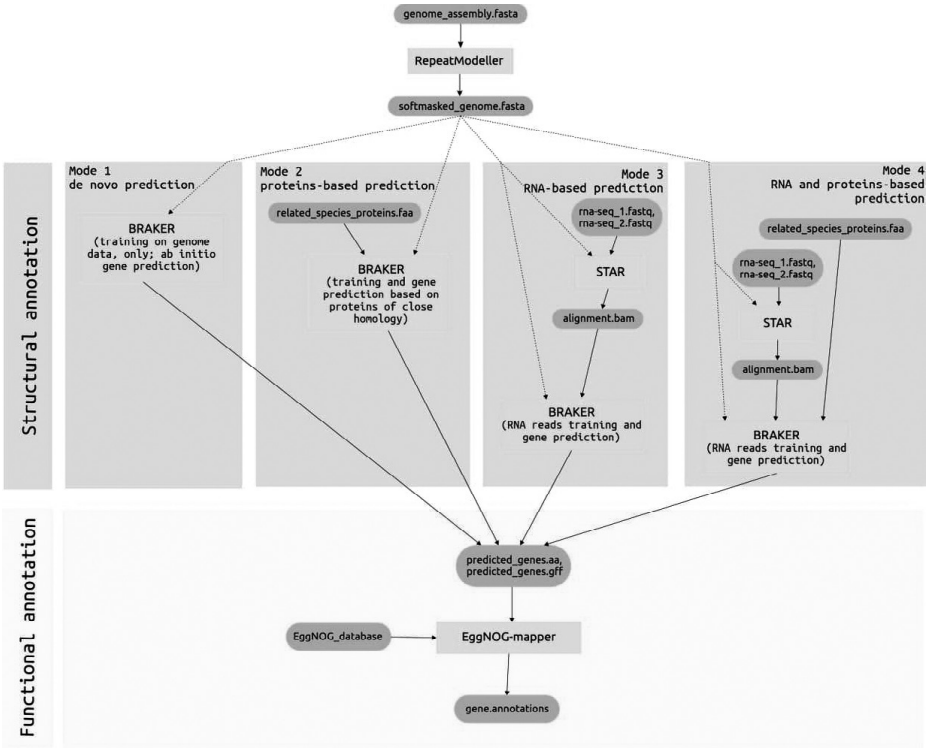
Д. С. Зилов, С. Д. Очкалова, А. С. Комиссаров

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: zilov.d@gmail.com

Аннотация

Аннотация геномов многоклеточных животных *de novo* сложный, долгий и ресурсозатратный процесс. В зависимости от размера генома и мощности сервера он может продолжаться от нескольких недель до нескольких месяцев*. Сейчас существуют приложения для осуществления нескольких этапов подготовки генома и его аннотации: маскирование повторов, предсказание генов, функциональная аннотация генов. Чтобы избежать случайных ошибок при проведении аннотации, мы разработали приложение PANIMAN, осуществляющее все шаги анализа в автоматическом режиме. Алгоритм работы приложения показан на рисунке.



Алгоритм работы PANIMAN. Для запуска требуется только сборка генома в FASTA-формате, маскирование генов осуществляется с помощью RepeatModeler и RepeatMasker, предсказание генов с помощью BRAKER 2, функциональная аннотация — с помощью EggNOG-mapper.

PANIMAN позволяет проводить анализ в четырех режимах. Первый режим осуществляет аннотацию только с помощью сборки генома. Второй и третий режимы используют белковые последовательности ближайшего референса и данные секвенирования РНК для обучения модели и предсказания генов соответственно. Четвертый режим использует и белковые последовательности, и данные РНК-секвенирования совместно для предсказания. Пайплайн был использован для аннотации двух геномов попугаев *Amazona collaria* и *Amazona agilis*. PANIMAN находится в открытом доступе по ссылке https://github.com/aglabx/paniman.

© Д. С. Зилов, С. Д. Очкалова, А. С. Комиссаров, 2021

* См. статистику: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk.

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В АНАЛИЗЕ ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ В КЛЕТКАХ ЭМБРИОНА ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ПРОЦЕДУРЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

К. Б. Игнатов [1], М. А. Борисова [1,2],
А. Ю. Гаранин [1,2], М. С. Анисименко [1,2], С. П. Коваленко [1,2]

[1] ООО «ДНК-дисплей», Новосибирск
[2] ООО «БиоЛинк», Новосибирск

E-mail: mariazolot@yandex.ru

Аннотация

Разработана система для анализа анеуплоидий по результатам NGS-секвенирования. Пробоподготовка образцов включает полногеномную амплификацию, ферментативную фрагментацию, добавление служебных последовательностей, обогащение полученных библиотек и анализ данных с помощью программного обеспечения.

Преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) в последние годы становится важнейшим элементом в протоколах ЭКО. Проведение ПГТ обеспечивает возможность выбирать для имплантации эмбрионы без хромосомных нарушений, что увеличивает вероятность наступления беременности, а также существенно снижает вероятность рождения детей с хромосомными патологиями после процедуры ЭКО. Анеуплоидии являются наиболее распространенными патологиями доимплантационных эмбрионов. Выявление таких хромосомных нарушений можно эффективно проводить с помощью технологий массового параллельного секвенирования (NGS). Технологии анализа методом NGS требуют применения сложных дорогостоящих реагентов, российские аналоги которых отсутствуют на рынке. В то же время количество проводимых процедур ЭКО растет с каждым годом, процедуры ПГТ являются очень востребованными.

Для проведения ПГТ требуется до 100 нг геномной ДНК эмбриона. Поскольку одна клетка человека содержит около 7 пг ДНК, для проведения дальнейшего анализа необходимо применение полногеномной амплификации ДНК. Разработанная технология полногеномной амплификации позволяет увеличить количество геномной ДНК человека в образце с 10–500 пг до 1–2 мкг. В основе принципа полногеномной амплификации лежит улучшенная версия ПЦР с вырожденными праймерами. Для проведения амплификации используется уникальный фермент — SD ДНК-полимераза, представляющая собой мутантную форму Taq-полимеразы. В отличие от последней, SD-полимераза обладает мощной вытесняющей активностью, при этом у данного фермента отсутствует 5'-3'-экзонуклеазная активность. Такие свойства SD-полимеразы обеспечивают более высокий выход продукта ПЦР в сравнении с Taq-полимеразой. Вытесняющая активность SD-полимеразы также позволяет эффективно амплифицировать GC-богатые районы ДНК и участки вторичной структуры.

Методы NGS предполагают использование фрагментов двуцепочечной ДНК (дцДНК) небольшой длины (100–800 п. н.). Разработанная технология ферментативной фрагментации позволяет варьировать размер получаемых фрагментов в требуемом диапазоне. В основе метода лежит использование комбинации двух ферментов: ДНКазы I и SD ДНК-полимеразы. ДНКаза I вносит одноцепочечные разрывы в исходную дцДНК. Вытесняющая активность SD ДНК-полимеразы позволяет достроить цепь ДНК с получением перекрывающихся последовательностей двуцепочечных фрагментов. Полученные фрагменты имеют 3'-А выступы на концах и таким образом могут быть сразу использованы для присоединения служебных последовательностей — адаптеров с индексами. Приготовление ДНК-библиотек состоит из двух стадий. Сначала проводят лигирование фрагментов дцДНК с адаптерами, содержащими сайты связывания с поверхностью проточной кюветы секвенатора и два уникальных индекса для последующей идентификации исследуемого образца. Затем проводят обогащение полученных библиотек методом ПЦР.

Анализ полученных ДНК-библиотек проводится на приборе MiSeq (Illumina, США). Было разработано программное обеспечение, которое позволяет обрабатывать результаты секвенирования (fastq-файлы) и получать результат анализа в виде заключения. Фрагмент заключения, содержащий распределение полученных прочтений по хромосомам, представлен на рисунке. В результате анализа в образце была выявлена трисомия 21-й хромосомы.

Таким образом, была разработана система для анализа анеуплоидий, включающая полногеномную амплификацию, ферментативную фрагментацию, добавление адаптеров с индексами, обогащение полученных библиотек и анализ данных с помощью программного обеспечения.

© К. Б. Игнатов, М. А. Борисова, А. Ю. Гаранин, М. С. Анисименко, С. П. Коваленко, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С АЛЬБУМИНАМИ*

В. В. Илющенко [1,2], А. С. Павлова [1], И. А. Пышная [1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: v.ilyushchenko@g.nsu.ru

Аннотация

Самоорганизующиеся системы из биосовместимых молекул, обладающие наноразмерными характеристиками, такие как наночастицы и наногели, являются перспективными платформами для разработки конструкций с целью доставки терапевтических средств к их внутриклеточным мишеням. Составляющий более половины белковой фракции крови сывороточный альбумин (СА) за счет потенциально низкой иммуногенности, продолжительного времени полужизни, а также наличия в своей мультидоменной структуре сайтов связывания различных лигандов стал объектом многочисленных исследований в качестве одного из компонентов таких систем. Известно, что липофильные производные терапевтических нуклеиновых кислот (НК) обладают улучшенными характеристиками для их применения *in vitro* и *in vivo*, а именно более продолжительным временем циркуляции в организме и высокой эффективностью проникновения внутрь клеток. Основной причиной увеличения времени циркуляции таких производных НК является их способность к обратимому связыванию с сывороточными белками, в первую очередь с СА.

Ранее в ИХБФМ СО РАН был разработан метод синтеза додецил-содержащих олигонуклеотидных производных (ДСО). Цель данной работы — исследование нековалентного связывания ДСО, содержащих 1, 2 или 3 додецильных остатка, с человеческим (чСА) и бычьим (бСА) сывороточным альбумином.

С помощью метода задержки в полиакриламидном геле (ПААГ) было показано, что за счет наличия гидрофобных додецильных групп ДСО способны к связыванию с белками с образованием нековалентных ассоциатов (НА) определенной стехиометрии. Получено, что одна молекула альбумина способна связать до двух молекул ДСО с 3^2 додецильными остатками, характеризующегося наибольшей гидрофобностью. Методом микроскопического термофореза проведена оценка констант диссоциации НА. Установлено, что для всех ДСО при повышении концентрации белка в растворе (10^{-6}–10^{-5} М) происходит увеличение интенсивности начальной флуоресценции 5′-FAM-меченного ДСО. Данный диапазон соответствует стехиометрии связывания СА : ДСО ~ 1 : 0,5 — 1 : 2, что согласуется с данными, полученными методом задержки в геле. Показано, что сродство ДСО с 3 додецильными остатками к связыванию с СА сохраняется при различных значениях pH (4,8; 6,0; 7,5; 9,0), однако в случае с чСА зависит от присутствия NaCl в растворе. Методом динамического светорассеяния получено, что размер частиц СА : ДСО в растворе не превышает 10 нм.

Анализ нековалентных ассоциатов (НА) альбуминов с НК/НК-комплексами, содержащими ДСО, показал, что при любой последовательности добавления компонентов НА происходит процесс самоорганизации. При этом обнаружена различная электрофоретическая подвижность НА, в состав которых входят комплементарные и некомплементарные НК/НК-комплексы. Для нековалентных ассоциатов (альбумин, олиготимидилат-ДСО и полиаденилова ДНК) продемонстрировано образование высокомолекулярных ассоциатов.

Полученные результаты позволяют рассматривать ДСО и СА как соединения-прекурсоры для разработки способов получения самоорганизующихся систем, в том числе обладающих свойствами биосовместимых наночастиц и наногелей, для решения задач молекулярной биологии и биомедицины.

© В. В. Илющенко, А. С. Павлова, И. А. Пышная, 2021

* Работа выполнена в рамках базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1.

ОЦЕНКА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ, ГЕМОСОВМЕСТИМЫХ И АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПОКРЫТИЕМ*

Е. О. Кривкина

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово

E-mail: Leonora92@mail.ru

Аннотация

Оценка и результаты физико-механических, гемосовместимых и антимикробных свойств полимерных протезов с илопростом и катионным амфифилом, присоединенных посредством комплексообразования с поливинилпирролидоном (PVP).

Материалы и методы

Протезы Ø 4 мм двух видов были изготовлены методом электроспиннинга: из 12 % раствора поли(ε-капролактона) (PCL) для первого вида и 2 % раствора поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV) с 12 % поли(ε-капролактоном) для второго вида.

Для повышения тромборезистентных и антимикробных свойств матриксов была проведена модификация по собственной оригинальной методике, заключавшейся в формировании на внутренней поверхности протеза гидрогелевого покрытия из PVP, к которому методом комплексообразования присоединяли антиагрегант илопрост и катионный амфифил 1,5-бис-(4-тетрадецил-1,4-диазониабицикло[2.2.2]октан-1-ил) пентан тетрабромид, обладающий антимикробными и противовирусными свойствами.

В качестве контроля — немодифицированные образцы PCL и PHBV/PCL, в качестве групп сравнения — образцы PCL/PVP и PHBV/PCL/PVP.

Гемосовместимость матриксов оценивали по степени гемолиза эритроцитов, агрегации и адгезии тромбоцитов, согласно стандарту ISO 10993.4 с использованием свежей донорской крови.

Физико-механические свойства сосудистых протезов оценивали до и после присоединения лекарственного компонента.

Для оценки антимикробных свойств протезов было проведено бактериологическое исследование с использованием штаммов микроорганизмов, наиболее часто встречающиеся при инфекционных осложнениях в кардиохирургии: Klebsiella pneumonia spp.ozaena № 5055, Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Proteus mirabillis ATCC3177, Pseudomonas aeruginosa ATCC27853.

Результаты

Физико-механические испытания показали, что присоединение PVP к PCL- матриксам в 1,6 раза снизило предел прочности ($p < 0,05$) и недостоверно повысило модуль Юнга. У PHBV/PCL/PVP-матриксов прочностные свойства не изменились, но в 1,9 раза повысился модуль Юнга ($p < 0,05$). Присоединение илопрост/амфифила к PHBV/PCL- и PCL-матриксам не привело к изменению физико-механических свойств.

Степень гемолиза эритроцитов для всех разновидностей матриксов не превысила допустимые 2 %. Межгрупповые различия отсутствовали.

Сравнение агрегационной активности тромбоцитов у немодифицированных групп PHBV/PCL и PCL между собой достоверных отличий не выявило. Полимеризация с PVP несколько увеличила агрегацию тромбоцитов. Однако присоединение илопрост/амфифила в 6–7 раз снизило агрегацию тромбоцитов по сравнению с результатами интактной обогащенной тромбоцитами плазмы.

У PCL/PVP матриксов не выявлено достоверного изменения степени адгезии тромбоцитов к поверхности протезов относительно немодифицированных аналогов. Степень адгезии тромбоцитов увеличилась почти в 2 раза на фоне неизменного индекса их деформации у PHBV/PCL/PVP матриксов. Присоединение илопрост/амфифила в 1,5 раза уменьшило количество адгезированных тромбоцитов ($p < 0,05$).

Бактериологическое исследование матриксов, изученных в сравнительном аспекте, показало, что во всех образцах с амфифилом, подавление роста использованных штаммов микроорганизмов носило местное ингибирующее действие в месте наложения матриксов на агар. Зон задержки роста не выявлено. Полимерный состав матриксов и использованная доза ионизирующего излучения не привели к разнице в бактериостатических свойствах матриксов с амфифилом. Немодифицированные матриксы не обладали бактериостатическим эффектом: в месте наложения матриксов продолжался рост колоний.

© Е. О. Кривкина, 2021

* Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 20-15-00075 «Разработка биодеградируемого сосудистого протеза малого диаметра с атромбогенным и противомикробным покрытием».

АСИММЕТРИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ (S)-АЛАНИНА И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ

Е. В. Кузубова [1], А. Ф. Мкртчян [2], У. А. Круть [1], А. И. Радченко [1]

[1] Белгородский государственный национальный исследовательский университет
[2] Ереванский государственный университет, Армения

E-mail: 1015artek1015@mail.ru

Аннотация

В настоящее время во всем мире стоит проблема антибиотикорезистентности. В течение определенного времени ко многим известным препаратам большинство микроорганизмов уже выработали защитные механизмы. Поэтому поиск новых молекул с антибактериальными свойствами является важным направлением. Наиболее перспективной группой таких веществ считаются аминокислоты (АМК) небелкового происхождения (насчитывают более 700 представителей).

Непротеиногенные α-аминокислоты имеют широкий спектр биологической активности: антибиотики (леуциностатин А, циклосерин, винилглицин, α-метилтриптофан), психостимуляторы (метилфенидат), противоэпилептическое средство (габапентин), глипогликемический препарат (ситаглиптин) гипотензивное лекарственное вещество (α-метилтирозин). Оптимальный способ получения небелковых α-АМК — асимметрический синтез хиральных биологически активных соединений с заданной абсолютной конфигурацией атомов углеродного скелета, занимающий особое место в современной биоорганической химии.

Цель исследования — асимметрический синтез энантиомернообогащенных новых индолсодержащих аналогов α-аланина и их медико-биологических скриннинг.

Главным принципом асимметрического синтеза гетероциклически замещенных производных (S)-аланина стал метод ассиметрического стехиометрического синтеза, основанный на хиральном вспомогательном реагенте.

В ходе синтеза нами были выделены две целевые небелковые α-аминокислоты 2-амино-3-(2-метил-1Н-индол-1-ил)-пропановая кислота (1а) и 2-амино-3-(3-метил-1Н-индол-1-ил)-пропановая кислота (2а). Далее был проведен их биологический скрининг методом диффузионного (двухслойного) определения антибактериальной активности. В стерильные чашки Петри разливали фиксированный объем 2 % питательной среды с антибиотиком: Азитромицин — 50 мкг/мл, Аугментин — 50 мкг/мл, Хлорамфеникол — 10 мкг/мл, Амоксицилин — 50 мкг/мл, Азитромицин — 50 мкг/мл, Ципрофлоксацин — 50 мкг/мл, Роцефинил — 50 мкг/мл, Стрептомицин — 100 мкг/мл, Цефиксим — 50 мкг/мл, Канамицин — 50 мкг/мл. После того как среда застыла, производили посев суспензии клеток ночной культуры по 0,2 мл путем расплавления столбиков с 0,7%-ным питательным агаром. Далее на верхний слой наносили по 3 мкл раствора исследуемого вещества в концентрации 43,6 мкг/мл. По усредненному радиусу зон подавления роста судили об ингибирующем эффекте раствора с использованием статистического метода анализа.

В результате биологического скрининга было доказано, что вещество **2а** подавлял рост *Stenotrophomonas maltophilia* 9286, в то время как антибиотики не проявляли ингибирующей активности к данному микроорганизму. В свою очередь небелковая АМК **2а** не проявляла ингибирующей активности по отношению к следующим микроорганизмам: *Pseudomonas aeruginosa* 5249, *Pseudomonas aeruginosa* 9056, *Pseudomonas fluorescens* 9150. Небелковая АМК **1а** на исследуемых объектах проявляет слабую активность.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что небелковые АМК проявляют антибактериальную активность. Следует заметить, что положение метильной группы в индольном кольце ключевым образом влияет на биологическую активность.

© Е. В. Кузубова, А. Ф. Мкртчян, У. А. Круть, А. И. Радченко, 2021

GINOFIP-ПАЙПЛАЙН ДЛЯ ПОИСКА ОПЕРОНОВ С ГЕНАМИ ИНТЕРЕСА

П. Д. Кучур, А. С. Комиссаров

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: chesnokova@scamt-itmo.ru

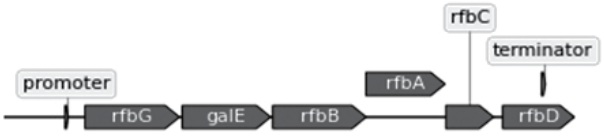
Аннотация

В свете стремительного накопления данных секвенирования необходимость создания новых инструментов, позволяющих автоматизировать их обработку, значительно возрастает. Особенно это касается бактериальных геномов. Мы неоднократно сталкивались с запросами обнаружения конкретного гена и оценки его окружения. Для этих и смежных целей мы создали новый алгоритм, работающий с бактериальными геномами на оперонном уровне.

Чем оперонный уровень анализа лучше генного? Во-первых, он позволяет учесть не только ген интереса, но и его окружение. Во-вторых, единичный малоизученный ген обнаружить легче по известным близлежащим генам, особенно если этот ген трудно аннотировать. И наконец, перейдя на уровень оперонов, можно обнаружить дополнительные регуляторные элементы, действующие на ген интереса. Чтобы автоматизировать процесс поиска оперонов, в которых находятся гены интереса, нами был разработан алгоритм, который не только упрощает процесс поиска, но и минимизирует возможные ошибки, появляющиеся на разных этапах обработки данных.

На первом этапе анализа разработанный пайплайн оценивает качество исходной сборки бактериального генома. В случае низкого качества предусмотрена опция выравнивания генома на эталонный геном ближайшего родственного организма. На втором этапе геном аннотируется тремя инструментами, что позволяет получить сводную аннотацию с минимумом ошибок. Дополнительно гены и их продукты, которые остались не аннотированы или, предположительно, были аннотированы неверно, могут быть проверены BLAST. Следующий этап — выделение границ оперонов. После выявления оперонов с генами интереса их границы дополнительно проверяются поиском промоторных и терминаторных областей. Итоговый оперон с уточненными границами визуализируется авторским скриптом на языке Python с использованием библиотеки Dna Features Viewer. Таким образом, на выходе пользователь получает полную структурную и функциональную характеристику состава оперонов интереса.

Пайплайн уже показал свою эффективность в поиске оперонов О-антигена (см. рисунок) и находится в стадии разработки полностью автоматизированной версии.



Пример визуализации оперона О-антигена, обнаруженного с помощью GINOFIP

© П. Д. Кучур, А. С. Комиссаров, 2021

РАЗРАБОТКА МЕТОДА БИОМОЛЕКУЛЯРНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ С РЕЦЕПТОРНЫМИ БЕЛКАМИ GP17 ФАГА T7, GP12 ФАГА T4 И ФЛУОРОФИЛОМ B-ЛАКТАМАЗЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЭНДОТОКСИНОВ

И. В. Лазарев

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

E-mail: ivanlazarev09042003@gmail.com

Аннотация

Предлагается новый метод обнаружения эндотоксинов, основанный на применении BiFC с использованием белков gp17 и gp12 бактериофагов T7 и T4, связывающих области внутреннего и внешнего ядра ЛПС-эндотоксина в качестве рецепторов, и комплементационных фрагментов BLF [1] MT (M182T) и BLF [2] β-лактамазы, прикрепленных к белкам посредством гибких линкеров в качестве флуоресцентного белка. Связывание gp17 и gp12 с консервативным ядром эндотоксина приведет к соединению фрагментов β-лактамазы и ее флуоресценции.

Сегодня, несмотря на появление множества эффективных методов, по совокупности параметров длительности теста, его цены, чувствительности и практичности LAL-тест на основе плазмы мечехвостов занимает лидирующие позиции на рынке, что, в свою очередь, приводит к сокращению численности этого вида и видов, зависящих от него трофически. Этим обусловлена необходимость разработки новых, быстрых и чувствительных методов в этой сфере. Крайне перспективно выглядит метод BiFC, развитие которого может привести к появлению нового высокочувствительного недорогого теста, не требующего специального оборудования и длящегося всего несколько минут.

Для теста необходимы ЛПС-специфичные белки, связывающиеся с консервативным участком эндотоксина. Оптимальнее всего сегодня выглядит использование gp17, выполняющего функцию рецептора бактериофага T7 [1], связывающегося с областью внутреннего ядра ЛПС [2], и белка gp12 фага T4, связывающегося с областью внешнего ядра ЛПС. Необходимыми параметрами BiFC в нашем случае являются небольшое время теста и яркость излучения. Таких параметров можно достичь, используя BLF [1] MT (M182T) и BLF [2] фрагменты β-лактамазы в качестве флуоресцентного белка, ее использование характеризуется высокой точностью и скоростью, более того, тесты с ее использованием просты, недороги и не требуют специального оборудования [3]. Белки gp12 фага T4 и gp17 фага T7 прикрепляются рядом, в зоне консервативного ядра эндотоксина, способствуя соединению фрагментов β-лактамазы и флуоресценции.

Дальнейшее развитие метода может быть связано с получением новых ЛПС-специфичных белков и разработкой более эффективных комплементационных пар для метода BiFC.

Литература

1. Garcia-Doval C., van Raaij M. J. Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of bacteriophage T7 tail fibers // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. Vol. 109 (24). P. 9390–9395.

2. Picken R. N., Beacham I. R. Bacteriophage-resistant mutants of Escherichia coli K12. Location of receptors within the lipopolysaccharide // Society for General Microbiology. 1977. Vol. 102 (2). P. 305–318.

3. Galarneau A., Primeau M., Trudeau L. E. et al. β-Lactamase protein fragment complementation assays as *in vivo* and *in vitro* sensors of protein-protein interactions // Nat Biotechnol. 2002. Vol. 20. P. 619–622.

© И. В. Лазарев, 2021

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*S. TUBEROSUM* L.) С НОКАУТ-МУТАЦИЕЙ ГЕНА *STLEAFY* С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9*

М. В. Лебедева, В. В. Таранов, Р. А. Комахин, Л. Н. Коновалова, Л. А. Иванова, А. В. Бабаков, Н. Е. Злобин

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

E-mail: marilistik@mail.ru

Аннотация

С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 были получены растения картофеля (*S. tuberosum* L.) с нокаут-мутациями во всех четырех аллелях гена *StLEAFY*, одного из ключевых регуляторов перехода к цветению.

Картофель (*S. tuberosum* L.) является важнейшей незерновой сельскохозяйственной культурой. Актуальными задачами картофелеводства в нашей стране являются повышение урожайности и переход к возделыванию новых сортов с комплексом технологических свойств, востребованных промышленностью. Многие технологические свойства культурного картофеля обусловлены мутациями в хозяйственно-ценных генах. Традиционные методы селекции позволяют создавать новые сорта культурного картофеля путем его скрещиваний с дикорастущими растениями-донорами генов хозяйственно-ценных признаков. Однако это дорогой и длительный процесс, не гарантирующий положительных результатов.

Одним из решений этой проблемы стала разработанная в 2012 году технология редактирования генома CRISPR/Cas9. Эта технология позволяет быстро и целенаправленно вносить мутации во все аллели конкретного гена даже у тетраплоидных сортов картофеля.

У картофеля прекращение формирования цветков и плодов может приводить к увеличению урожайности. Это косвенно подтверждается повышением урожайности при механическом удалении цветков, а также тем, что многие современные высокоурожайные сорта характеризуются меньшим количеством цветков и/или плодов. Поскольку картофель для промышленных целей размножают преимущественно вегетативно, создание нецветущего картофеля является перспективным способом повышения его урожайности.

Одним из возможных способов блокирования цветения на картофеле является инактивация гена *StLEAFY*, гомолога гена *LFY* арабидопсиса, который является одним из основных регуляторов формирования цветковых меристем. Отсутствие функционального белкового продукта этого гена приводит к образованию листоподобных структур или побегов вместо генеративных органов, что было показано для таких мутантных растений семейства Пасленовые, как петуния и томат.

В данной работе для внесения нокаут-мутаций в ген *StLEAFY* картофеля сорта «вектор» (оригинатор ВНИИКХ им. Лорха) было определено аллельное разнообразие гена *StLEAFY* этого сорта и подобраны две гидовые РНК на консервативные области первого экзона. Нуклеотидные последовательности, кодирующие гидовые РНК, были клонированы в плазмидный вектор для геномного редактирования растений pKSE401. Созданными генетическими конструкциями выполнили агробактериальную трансформацию асептических листовых эксплантов картофеля сорта «вектор». Затем на селективной питательной среде для регенерации отобрали каллусы и побеги, устойчивые к антибиотику Канамицину. После адаптации растений-регенерантов картофеля к условиям теплицы с них были взяты образцы тканей для оценки эффективности геномного редактирования целевого локуса гена *StLEAFY* с помощью таргетного NGS-секвенирования. В результате с использованием обеих гидовых РНК были получены трансгенные растения картофеля с нокаут-мутациями всех четырех аллелей гена *StLEAFY*. Наиболее распространенным вариантом внесенных мутаций были одно- и двунуклеотидные делеции, приводящие к нарушению рамки считывания.

© М. В. Лебедева, В. В. Таранов, Р. А. Комахин, Л. Н. Коновалова, Л. А. Иванова, А. В. Бабаков, Н. Е. Злобин, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке комплексного плана научных исследований «Развитие селекции и семеноводства картофеля».

СИНТЕЗ МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА *

В. Р. Литвинова [1,2], С. В. Шарабрин [1], А. П. Рудомётов [1], Л. И. Карпенко [1], А. А. Ильичёв [1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

Аннотация

Технология мРНК-вакцин позволяет легко заменять целевой ген, не меняя технологию производства, благодаря чему возможно быстро реагировать на появление новых пандемических инфекций, что особенно актуально для вируса гриппа. В данной работе подобраны условия получения мРНК, кодирующей фрагмент гемагглютинина вируса гриппа, условия очистки мРНК, кэпирования и полиаденилирования. На модельной мРНК, кодирующей GFP, показано, что экспрессия GFP выше в случае, когда в состав мРНК включен псевдоуридин.

Разработка вакцин против гриппа имеет большое значение, так как вирус гриппа вызывает миллионы заболеваний и до 650 000 смертей во всем мире каждый год. Процесс производства вакцины против актуальных штаммов гриппа требует длительного времени, поэтому есть необходимость разработки новых типов вакцин. В последние несколько лет мРНК рассматривается как перспективная платформа для быстрого получения вакцин. Вакцины на основе мРНК способны активизировать оба звена иммунитета (Т- и В-клеточное). Производство мРНК — это быстрое, масштабируемое и однотипное производство. Платформа мРНК-вакцин позволяет легко проводить замену целевого гена, не изменяя технологию производства, благодаря чему появляется возможность быстро реагировать на появление новых пандемических инфекций, что особенно актуально для вируса гриппа.

Целью работы являлось получение мРНК, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа.

Синтез мРНК проводили с помощью химико-ферментативного метода. Работа состояла из нескольких этапов. Вначале проводили получение и очистку линеаризованных плазмид (ДНК-матриц), содержащих последовательности, кодирующие антиген вируса гриппа (фрагмент белка гемагглютинина, HA) или GFP (для использования в качестве контроля). Затем проводили наработку РНК с полученных ДНК-матриц с использованием Т7-полимеразы и смеси рибонуклеотидов с уридином или с заменой уридина на псевдоуридин. Далее проводили очистку полученной РНК и обработку ДНКазой для удаления ДНК-матрицы. На заключительном этапе проводили кэпирование и полиаденилирование РНК соответствующими ферментами. О функциональности полученных мРНК судили по синтезу белка GFP в культуре клеток HEK293T, трансфицированных мРНК-GFP.

Таким образом, в ходе работы была получена мРНК, кодирующая антиген вируса гриппа; проведена ее очистка, кэпирование, полиаденилирование. На модели GFP показана функциональность полученных мРНК. Показано, что экспрессия GFP выше в случае, когда в состав мРНК включен псевдоуридин. Полученная мРНК, кодирующая HA, будет исследована на модели животных на способность вызывать иммунный ответ против вируса гриппа.

© В. Р. Литвинова, С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв, 2021

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS SEROTYPES FOR *IN VITRO* ASSESSMENT OF GNAO1 ENCEPHALOPATHY GENE THERAPY

E. A. Lunev [1–3], S. G. Vassilieva [1,2], A. A. Shmidt [1–3], T. V. Egorova [1,2], M. V. Bardina [1–3]

[1] *Institute of Gene Biology RAS, Moscow*
[2] *Marlin Biotech LLC, Sochi*
[3] *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology RAS, Moscow*

E-mail: e.lunev.marlin@gmail.com

Abstract

Our study presents the characterization of five recombinant adeno-associated virus serotypes by tropism to Gαo-positive cells and toxicity in primary neuronal culture. We demonstrated that AAV-DJ has the highest potential as a gene delivery vehicle to Gαo-positive cells. AAV-DJ was successfully tested *in vitro* as a vector for two possible gene therapy approaches for GNAO1 encephalopathy.

GNAO1 encephalopathy is a rare neurodevelopmental disorder characterized by developmental delay, abnormal movements, and early infantile epileptic encephalopathy. The disease is caused by dominant *de novo* mutations in the GNAO1 gene, resulting in impaired Gαo protein functions. Currently, there is no cure for GNAO1 encephalopathy, and symptomatic therapy is ineffective. Advances in targeted gene therapy have opened up avenues for the treatment of neurological disorders. The range of methods extends from "classical" gene replacement therapy and less common gene suppression to novel approaches based on DNA and RNA editing. One of the important aspects for validation of a gene therapy approach *in vitro* is the choice of the optimal delivery vehicles. In the present study, we characterized five serotypes of recombinant adeno-associated virus vectors (rAAVs) by tropism to Gαo-positive cells and toxicity in primary neuronal culture. We produced and purified recombinant viral particles of 1, 2, 6, 9 and DJ AAV serotypes encoding GFP as a reporter gene. Primary neuronal culture obtained from the whole brain of newborn mice was infected with rAAVs at the multiplicity of infection 10^5 genome copies per cell. We evaluated the level of GFP expression by western blot and the tropism of AAV serotype to Gαo-positive neurons by immunocytochemistry. The cytotoxicity was assessed in the PrestoBlue assay. We report that AAV6 and AAV-DJ showed the highest GFP expression level and colocalization with Gαo-positive neurons. However, only AAV-DJ has high potential as a gene delivery vehicle, since AAV6 exhibits a significant level of cytotoxicity. Finally, we tested AAV-DJ for two potential gene therapy approaches for GNAO1 encephalopathy. We cloned AAV-GNAO1 vector encoding myc-tagged wild-type Gαo protein as an example of gene replacement therapy. We demonstrated the expression of exogenous GNAO1 in transduced neurons by western blot using tag-specific antibodies. For gene silencing approach we assembled rAAV encoding a short hairpin RNA targeting GNAO1 transcript. We determined two-fold downregulation of GNAO1 expression by qPCR and western blot. Thus, we conclude that AAV-DJ is the optimal serotype for testing gene therapy approaches for GNAO1 encephalopathy *in vitro*. In the future, we plan to use AAV-DJ as a delivery vehicle for the novel gene therapy approaches such as CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas13, and DNA-base editors.

rAAV tropism assessment to Gao-positive neurons by colocalization with GFP

AAV serotype	Number of Gαo positive cells	Number of double-positive cells (Gαo/GFP)	Percentage of colocalization, %
AAV1	4170	801	19
AAV2	2428	610	25
AAV6	2778	1651	59
AAV9	2773	226	8
AAV-DJ	1866	1226	66

© E. A. Lunev, S. G. Vassilieva, A. A. Shmidt, T. V. Egorova, M. V. Bardina, 2021

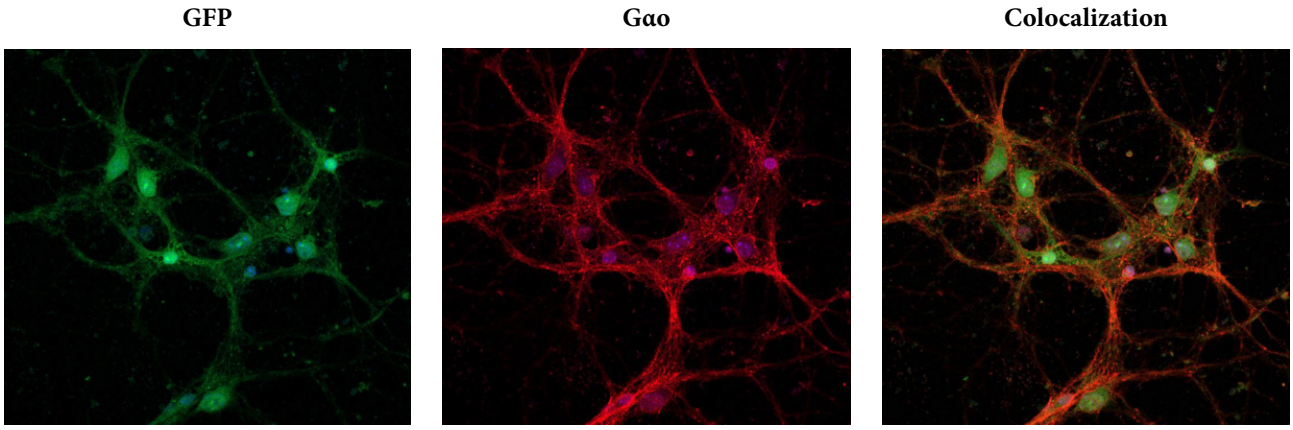


Fig. 1. rAAV-DJ (green) transduces Gαo-positive neurons (red) in primary neuronal culture

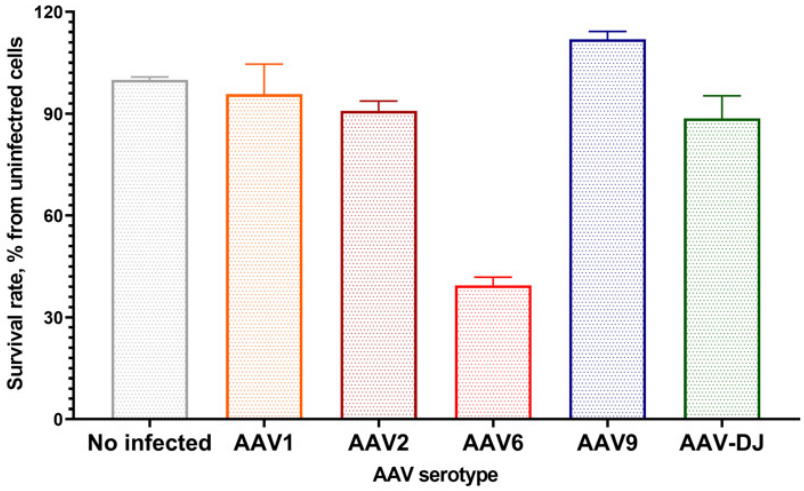


Fig. 2. Toxicity of AAV serotypes on primary neuronal cultures (mean +/–SD)

СИНТЕЗ АКРИЛОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЖЕЛЕЗО-КООРДИНАЦИОННЫЕ СВЯЗИ

О. В. Лунева, А. Д. Фатеев, М. В. Успенская

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: ovlunevaitmo@gmail.com

Аннотация

Многообразие кожных заболеваний побуждает к созданию и модернизации новых специализированных полимерных материалов. Большое внимание вызывают двухслойные повязки, позволяющие проявлять многофункциональные характеристики в зависимости от технологии приготовления и целевого назначения конечного материала. В ходе работы были синтезированы гидрогели на основе акриловой кислоты и акриламида со свободно-радикальной и железо-координационными связями с дальнейшим изучением кинетики сорбции.

С каждым годом проблема анемии становится все более глобальной. Болезнь поражает подгруппу из двух миллиардов людей во всем мире. Она неравномерно распределена по всему миру, в слаборазвитых регионах наблюдается пятикратный рост. В некоторых регионах мира распространенность анемии среди детей раннего возраста составляет > 50 %, в некоторых регионах приближается к 100 %, а 40–50 % населения остаются анемичным в любом возрасте [1].

Гидрогели в настоящее время имеют обширную область применения, особенно в медицине. Важным критерием выбора основы для создания таких материалов является их биоразлагаемость и биоактивность. Из-за большого содержания воды разработанные полимерные материалы имеют достаточную биосовместимость и могут быть получены с содержанием воды, очень похожим на содержание биологических тканей (70 %).

Гидрогели имеют ограниченный потенциал в сорбции, поэтому не подходят для ран с повышенной влажностью, так как могут разрушиться и привести к заражению. Кроме того, их низкая механическая прочности затрудняет замену повязок [2].

Однако разработка гидрогелей с сочетанием превосходных механических свойств, универсальных функций и хорошей обрабатываемости является сложной задачей. В гидрогеле поли(акриламид-со-акриловой кислоты) (P(AAm-co-AAc)), сшитом координационными комплексами карбоксильного Fe^{3+}, сополимеры имеют случайно распределенные повторяющиеся единицы AAm и AAc, образуя физические поперечные связи с различной прочностью. Сильные координационные связи и их ассоциации служат постоянными поперечными связями, придающими эластичность, в то время как слабые обратимо разрываются и переформировываются, рассеивая энергию [3].

В работе были получены гидрогели на основе акриловой кислоты и акриламида свободно-радикальной и железо-координационными связями с дальнейшим изучением кинетики сорбции.

Литература

1. Miller J. L. Iron deficiency anemia: a common and curable disease // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2013. Vol. 3. № 7. P. a011866.

2. Thomas L. (2019, February 27). Hydrogel Dressings. News-Medical. Retrieved on August 30, 2021. URL: https://www.news-medical.net/health/Hydrogel-Dressings.aspx.

3. Zheng S. Y., Ding H., Qian J. et al. Metal-Coordination Complexes Mediated Physical Hydrogels with High Toughness, Stick–Slip Tearing Behavior, and Good Processability // Macromolecules. 2016. Vol. 49(24). P. 9637–9646.

© О. В. Лунева, А. Д. Фатеев, М. В. Успенская, 2021

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТА *PRUNELLA GRANDIFLORA* L. ОТНОСИТЕЛЬНО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ЭТОПОЗИД НА ПРИМЕРЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER* *

Н. Магомбе [1], О. Н. Антосюк [1], Е. В. Болотник [2]

[1] *Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург*
[2] *Ботанический сад УрО РАН, Екатеринбг*

E-mail: antosuk-olga@mail.ru

Аннотация

Тестировали экстракт *P. grandiflora* в отношении препарата этопозид на примере модельного объекта *Drosophila melanogaster*. Обнаружили наличие антитоксических и антицитотоксических свойств у данного экстракта относительно обеих тестируемых в работе концентраций этопозида 800 и 8000 мкг/кг питательной среды.

Использование протекторов и адаптогенов для минимизации побочных эффектов противоопухолевых препаратов и других лекарственных средств является одним из важных направлений в медицинской практике. В качестве протекторов активно тестируются экстракты лекарственных растений. Эффективность протекции может зависеть от схемы введения (последовательности) в паре «протектор — лекарственный препарат». В связи с этим целью исследования стало выявление эффективности протекторных свойств экстракта *P. grandiflora* в отношении препарата «этопозид», тестируемого в разных концентрациях 800 и 8000 мкг/кг на примере модельного объекта *Drosophila melanogaster.* Для анализа протекторных свойств применяли следующие методы исследования: определение общей летальности особей, определение изменения фертильности особей и эмбриональной доминантной гибели F_1, SMART (метод определения частоты соматических мутаций и рекомбинаций) и определение регулируемой клеточной гибели (РКГ) в крыловом имагинальном диске.

В работе тестировали три схемы введения в отношении определения общей летальности: 1) введение экстракта перед введением этопозида, 2) введение экстракта и этопозида одновременно, 3) введение экстракта после введения этопозида. Все схемы введения осуществлялись *per os*, культивированием на питательных средах.

Обнаружили, что использование схемы введения № 1 приводит к увеличению общей летальности особей до 54 %, что свидетельствует о нецелесообразности ее применения. В данной экспериментальной группе обнаружили особей с фенокопиями по типу hemithorax и apterous (по предварительным данным: среди 78 особей 6 с фенокопиями), что свидетельствует о явном токсическом усилении свойств этопозида на фоне предварительного воздействия экстрактом, что свидетельствует о возможном синергизме при последовательном введении: вначале

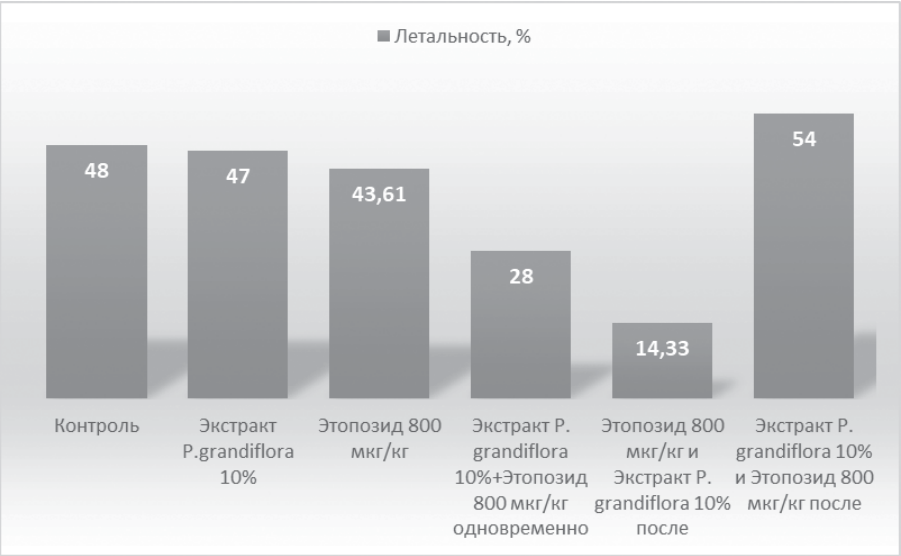


Рис. 1. Частота общей летальности особей линии Oregon-R *D. melanogaster* в экспериментальных группах

© Н. Магомбе, О. Н. Антосюк, Е. В. Болотник, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке постановление № 211 Правительства Российской федерации, контракт № 02.A03.21.0006.

экстракт, затем этопозид. Схема введения № 3 характеризуется наименьшим показателем летальности особей относительно контрольной выборки.

Показатели жизнеспособности, а именно уровень фертильности (18,27) и частота эмбриональной доминантной летальности потомства F_1 (ранняя летальность — 0,73 %, поздняя — 0,12 %) у особей при использовании 10 % экстракта *P. grandiflora* совместно с этопозидом 800 мкг/кг характеризуются большим протекционным потенциалом, чем те же показатели при применении 10 % экстракта *P. grandiflora* совместно с этопозидом 8000 мкг/кг (фертильность — 5,41, ранняя летальность — 15,12%, поздняя — 3,39 %). По предварительным данным SMART-анализа не обнаружили антигенотоксических проявлений экстракта (при воздействии этопозида частота мутаций и рекомбинаций — 2,64 %, при воздействии экстракта и этопозида 800 мкг/кг — 1,95 %, тогда как в контроле — 0,45 %). Как видно на рис. 2, сопутствующее воздействие экстракта совместно с этопозидом в концентрации как 800 мкг/кг, так и 8000 мкг/кг приводит к снижению показателя РКГ во всех 4-х компартментах крылового имагинального диска.

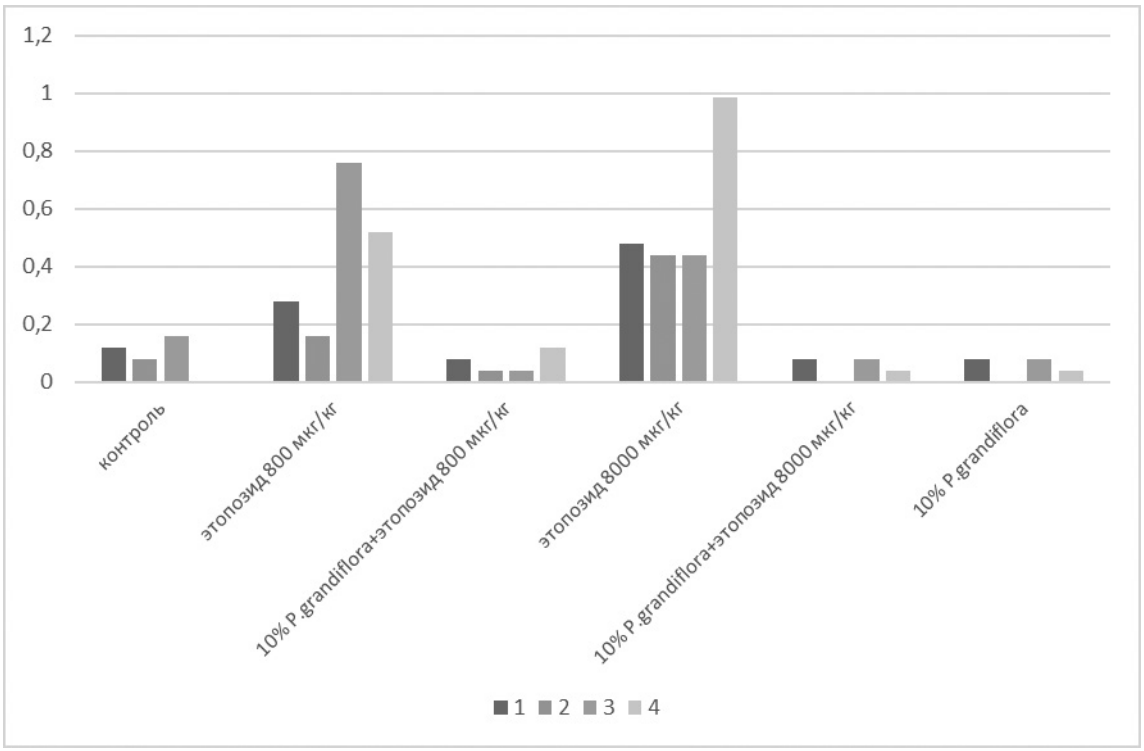


Рис. 2. Среднее значение по рангу РКГ (регулируемой клеточной гибели) относительно 4-х компартментов крылового имагинального диска *D. melanogaster* в экспериментальных группах

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПОКРЫТИЙ С ФУНКЦИЕЙ ДЕПО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Г. М. Медетова

Томский политехнический университет

E-mail: gaukhar_medetova@mail.ru

Аннотация

Предлагаемый в работе метод адресной доставки лекарственного вещества заключается в насыщении пористого кальций-фосфатного покрытия, полученного методом МДО, биодеградируемым композитом на основе полимера — поли-ε-капролактона — и антибактериального лекарственного вещества — хлорамфеникола (ХФ). Таким образом можно не только обеспечить адресную доставку антибактериального средства, но и уменьшить хрупкость кальций-фосфатного покрытия за счет пропитки его полимерным связующим. **Целью** работы является изучение морфологии, элементного состава, антибактериальной активности сформированных биоактивных покрытий, а также выхода антибактериального лекарственного средства из покрытий.

В настоящее время для восстановления живых тканей все чаще применяются металлические имплантаты с модифицированной поверхностью [1, 2]. Кальций-фосфатные покрытия на основе гидроксиапатита ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$; ГА), имеющего состав, близкий к человеческой кости, являются перспективными для применения в травматологии и ортопедии [3]. Для нанесения кальций-фосфатных покрытий применяется метод микродугового оксидирования (МДО). Метод МДО позволяет получить пористые, шероховатые покрытия требуемого химического состава. Однако МДО-покрытия имеют хрупкость выше, чем у кортикальной кости, поэтому при моделировании и установке имплантата целостность покрытия может нарушаться [4]. Кроме того, при операции возможно инфицирование области хирургического вмешательства (ИОХВ). Локальная доставка лекарственных средств (ЛС), прежде всего антибактериальных, позволяет предотвратить осложнения, связанные с ИОХВ.

Формирование кальций-фосфатных покрытий осуществлялось на дисках из титана марки ВТ-6 диаметром 10 мм и толщиной 2–3 мм методом микродугового оксидирования на установке, разработанной в ТПУ. Для пропитки образцов были приготовлены растворы полимера поликапролактона (ПКЛ) (Sigma Aldrich, Германия) с лекарственным средством хлорамфениколом (Фармстандарт, Россия) в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропаноле (ГФИП) (ЭКОС-1, Россия).

В результате работы получены титановые образцы с кальций-фосфатными покрытиями, депонированными хлорамфениколом. Исследованы их морфология, элементный состав, а также высвобождение хлорамфеникола из покрытий. Морфология кальций-фосфатных покрытий характеризуется выраженной пористостью, нанесение полимерного композита сохраняет пористую структуру покрытия. Соотношение кальция к фосфору для всех покрытий составляет в среднем 0,6. Показан пролонгированный выход препарата в течение 7 суток. Антибактериальные свойства полученных покрытий с хлорамфениколом проявились менее чем через сутки после помещения образцов в бактериальную среду и наблюдались в течение следующих шести дней эксперимента. Было установлено, что при превышении концентрации хлорамфеникола более 15 масс.% не происходит дальнейшего заметного улучшения бактерицидных свойств образцов.

Литература

1. Liu Y. et al. Role of implants surface modification in osseointegration: A systematic review // Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2020. Vol. 108. № 3. P. 470–484.

2. Narayanan R. et al. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. 2008. Vol. 85. № 1. P. 279–299.

3. Arcos D., Vallet-Regí M. Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants // Journal of Materials Chemistry B. 2020. Vol. 8. № 9. P. 1781–1800.

4. Komlev V. S., Barinov S. M., Rustichelli F. Strength enhancement of porous hydroxyapatite ceramics by polymer impregnation // Journal of materials science letters. 2003. Vol. 22. № 17. P. 1215–1217.

© Г. М. Медетова, 2021

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА (RBD) S-БЕЛКА SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Ю. А. Меркульева, Д. В. Шаньшин, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков

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

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

Аннотация

Рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка успешно используется для создания диагностикумов и вакцин против нового коронавируса SARS-CoV-2. Нами предложен новый метод получения RBD в клетках *E. coli* в растворимой форме с использованием коронавирусной протеазы 3CL.

Попытки получения RBD в экспрессионной системе *E. coli* приводят к накоплению белка в тельцах включения, что осложняет его очистку а также требует проведения дополнительной стадии рефолдинга [1–4]. Кроме того, RBD, полученный таким образом, уступает по антигенным и иммуногенным свойствам RBD, полученному с помощью клеток млекопитающих (CHO-K1) [1]. Несмотря на привлекательность продуцентов на основе клеток млекопитающих, получение белка в бактериальной системе экспрессии значительно дешевле и проще. Возможно, продукция растворимой формы RBD в *E. coli* обеспечит его нативный фолдинг и позволит улучшить его антигенные и иммуногенные свойства.

Целью данной работы была разработка метода получения RBD в растворимой форме в клетках *E. coli*.

Идея заключалась в получении химерного белка, содержащего на *N*-конце белок, обеспечивающий транспорт в периплазму клеток *E. coli*, и последующем его расщеплении по специфическому сайту с помощью эффективной протеазы. Для этого на основе вектора pET21a были сконструировали плазмиды, обеспечивающие продукцию белков RBD и коронавирусной протеазы 3CL, слитых с глутатион-S-трансферазой (GST). Между целевыми белками и GST был заложен сайт протеолиза 3CL (*SAVLQS*↓GF).

После траснформации клеток *E. coli* каждой из плазмид было обнаружено, что белок слияния GST обеспечивает продукцию обоих белков в растворимой форме, притом протеаза 3CL отщепляла себя от GST. При котрансформации обеих плазмид было показано, что протеаза так же эффективно отщепляла RBD от GST, обеспечивая продукцию растворимой формы RBD в клетках *E. coli*. Снижение концентрации индуктора ИПТГ до 0,1 мМ и температуры культивирования до 18 °C приводило к увеличению выхода RBD. Полученный белок был выделен и очищен с помощью Ni-аффинной хроматографии, антигенные свойства RBD были подтверждены в ИФА с помощью сывороток реконвалесцентных доноров.

Литература

1. Меркульева Ю. А., Щербаков Д. Н. Разработка и характеристика иммуногена на основе рецептор-связывающего домена (RBD) гликопротеина S нового коронавируса SARS-COV-2 // Управляемые и другие социально-значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика: материалы Российской научно-практической онлайн конференции (3–4 февраля 2021 г., Санкт-Петербург). С. 85–86.

2. Márquez-Ipiña A. R., González-González E., Rodríguez-Sánchez I. P. et al. Serological Test to Determine Exposure to SARS-CoV-2: ELISA Based on the Receptor-Binding Domain of the Spike Protein (S-$RBD_{N318-V510}$) Expressed in *Escherichia coli* // Diagnostics (Basel). 2021. Vol. 11, № 2. P. 271.

3. Fitzgerald G. A., Komarov A., Kaznadzey A. et al. Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319–640 in *E. coli*, and its refolding and purification // Protein Expr Purif. 2021. Vol. 183. P. 105861.

4. He Y., Qi J., Xiao L. et al. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli* // Eng Life Sci. 2021. Vol. 21, № 6. P. 453–460.

© Ю. А. Меркульева, Д. В. Шаньшин, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, 2021

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКИ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ 3CL SARS-COV-2 В СИСТЕМЕ *E. COLI* *

К. Д. Назаров [1], С. В. Беленькая [1,2], Д. Н. Щербаков [2]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

E-mail: k.nazarov1@g.nsu.ru

Аннотация

В результате проделанной работы в ранее созданную генетическую конструкцию, обеспечивающую синтез основной коронавирусной протеазы (SARS-CoV-2 3CL), была введена последовательность 6His. Подобраны условия экспрессии целевого белка в системе *E. coli* в растворимой форме, а также составлен протокол очистки основной протеазы 3CL с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

SARS-CoV-2, как и многие другие одноцепочечные РНК-вирусы, использует химотрипсиноподобную протеазу (основная протеаза 3CL) для процессинга полипротеинов, транслируемых с вирусной РНК и необходимых для репликации вируса. Основная протеаза 3CL расщепляет два больших перекрывающихся полипротеина pp1a и pp1ab по меньшей мере в 11 консервативных сайтах [1, 2]. Зависимость репликации коронавируса от функционирования этого белка является причиной привлекательности основной протеазы 3CL в качестве мишени для создания специфических ингибиторов. В этой связи возникает потребность в получении препарата основной протеазы 3CL для исследовательских целей.

Целью данной работы являлось введение последовательности 6His в ранее сконструированную генетическую конструкцию (pET21-GST-3CL) [3] для обеспечения очистки целевого белка с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, а также оптимизация протокола экспрессии основная протеаза 3CL в системе *E. coli*.

Для достижения поставленной цели была проведена ПЦР с использованием праймеров 3CL-6His-F (3’-aaaaaaggatccacctcagctgttttgcagagcggttttcgtaaaatggcat-5’) и 3CL-6His-R (3’-aaaaaagcggccgcttagtggtgatggtgatgatgaccgctacctggtccctgaaaggtaacaccgctacactg-5’), в качестве матрицы выступала плазмидная ДНК вектора pET21-GST-3CL. Праймер R содержал в себе последовательность 6His. Вектор pET-GST-3CL и полученный ПЦР продукт были гидролизованы по сайтам BamHI/CciNI с образованием липких концов. В результате лигирования полученных фрагментов был сконструирован вектор pET-GST-3CL-6His.

Была проведена оптимизация условий экспрессии целевого белка в клетках *E. coli* штамма Bl21, трансформированных сконструированным рекомбинантным вектором. Для оптимизации использовалось три параметра — время (3, 6, 16 часов), температура (20, 30, 37 °C) и концентрация индуктора IPTG (10; 0,1; 0,01 мМ).

Выявлено, что наиболее эффективная экспрессия основной протеазы 3CL в растворимой форме происходит при 16 ч, 20 °C и 0,1 M IPTG. Подобранные условия хроматографической очистки позволяют получать фермент с концентрацией 0,8–1 мг/мл.

Литература

1. Gorbalenya A. E., Snijder E. J. Viral cysteine proteinases // Perspectives in Drug Discovery and Design. 1996. Vol. 6. № 1. P. 64–86.

2. Muramatsu T. et al. SARS-CoV 3CL protease cleaves its C-terminal autoprocessing site by novel subsite cooperativity // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. Vol. 113. № 46. P. 12997–13002.

3. Беленькая С. В. и др. Разработка прокариотической системы экспрессии основной протеазы 3CL SARS-CoV-2 // VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. 2020. P. 392.

© К. Д. Назаров, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-6015 Вирусы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЛЕНИЯ ГЕМОЦИТОВ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ*

А. А. Назарова, А. Н. Гурков, П. Б. Дроздова, М. А. Тимофеев

Иркутский государственный университет

E-mail: annazarova1995@gmail.com

Аннотация

Представлены результаты анализа клеточного цикла эмбриональных клеток разных стадий развития эмбрионов и гемоцитов амфипод *Eulimnogammarus vittatus* и *E. verrucosus* методом проточной цитометрии.

Озеро Байкал — самое большое пресноводное озеро с высоким уровнем эндемизма беспозвоночных. Эндемичные байкальские амфиподы (Amphipoda, Crustacea) —одни из ключевых компонентов экосистемы озера [1], и они демонстрируют существенные отличия в адаптивном потенциале к некоторым стрессорам по сравнению с их голарктическими аналогами [4]. Важным инструментом изучения молекулярных основ функционирования любого многоклеточного организма являются перевиваемые культуры его клеток, однако для байкальских амфипод ранее были получены только первичные культуры клеток. Наиболее удобными для выделения являются гемоциты амфипод, в то время как их эмбриональные клетки должны обладать наибольшим потенциалом деления, что определяет важность анализа клеточного цикла этих тканей.

В качестве объекта исследования были использованы эмбрионы амфипод *Eulimnogammarus vittatus* предполагаемой стадии развития между S16 и S21, а также эмбрионы стадии развития S27 и гемоциты амфипод *E. verrucosus* [3]. Эмбрионы механически дезагрегировали, просеивали через нейлоновое сито для избавления от агрегатов клеток и осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в буфере Galbraith, модифицированном по [2], содержащем йодистый пропидий (1 мг/мл). Гемоциты *E. verrucosus* отбирали стеклянным капилляром и смешивали 1 : 1 с антикоагуляционным раствором и смешивали с буфером Galbraith. Далее все клетки инкубировали в течение ночи в темном месте при 4 °C. Для дальнейшей визуализации использовали проточный цитометр (CytoFLEX, Beckman Coulter).

Было выявлено, что гемоциты взрослых амфипод *E. verrucosus* имеют лишь один пик свечения йодистого пропидия, что говорит о наличии окрашивания клеток, находящихся в интерфазе клеточного цикла. Полученные данные могут быть связаны с тем, что гемоциты высвобождаются в гемоцель из гематопоэтической ткани, что было описано на декаподах, и не имеют функциональной роли дальнейшего деления. Было выявлено, что как клетки эмбрионов ранней стадии *E. vittatus,* так и клетки более поздней стадии *E. verrucosus* находятся в интерфазе клеточного цикла. Полученные данные могут быть связаны с эмбриональной диапаузой, то есть остановкой развития эмбриона, возникшей вследствие содержания самок с яйцами в лабораторных условиях перед выделением клеток, что требует дополнительной проверки. Тем не менее полученные нами данные указывают на низкий потенциал получения перевиваемой линии на основе изученных типов клеток байкальских амфипод.

Благодарим компанию Helicon за предоставление оборудования для проведения испытаний. Отдельная благодарность руководителю направления «Клеточные технологии», зав. лаб. Helicon Ольге Худолеевой.

Литература

1. Тахтеев В. В. Очерки о бокоплавах озера Байкал: систематика, сравнительная экология, эволюция. Иркутск: Иркутский государственный университет, 2000. 355 с.

2. DeSalle R., Gregory T. R., Johnston J. S. Preparation of samples for comparative studies of arthropod chromosomes: visualization, in situ hybridization, and genome size estimation // Meth. Enzymol. 2005. Vol. 395. P. 460–488.

3. Browne W. E., Price A. L., Gerberding M. et al. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, Parhyale hawaiensi // Genesis 2005. Vol. 42. P. 124–149.

4. Axenov-Gribanov D. et al. Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and holarctic amphipods // PLOS ONE. 2016. Vol. 11. e0164226.

© А. А. Назарова, А. Н. Гурков, П. Б. Дроздова, М. А. Тимофеев, 2021

* Исследование было выполнено при поддержке гранта РНФ № 20-64-46003.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОСОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕПТИДАМИ RGD И GHK, В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ *

В. А. Николаева [1], М. Зухайб [1], Р. В. Павлов [2], Г. А. Гайнанова [2], Р. И. Гарифуллин [1], Т. И. Абдуллин [1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2] Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

E-mail: ViANikolaeva@stud.kpfu.ru

Аннотация

Синтезированы амфифильные производные пептидов RGD и GHK и охарактеризованы их мицеллообразующие свойства. Оценены коллоидные характеристики липосом, модифицированных пептидами, а также их взаимодействие с опухолевыми клетками.

Пептиды — перспективные лиганды в конструировании биоспецифичных/таргетных систем доставки лекарственных препаратов *in vitro* и *in vivo*. Амфифильные конъюгаты L-аргинил-глицил-L-аспарагиновой кислоты (RGD) и глицил-L-гистидил-L-лизина (GHK) с остатком лауриновой кислоты синтезировали методом твердофазного синтеза с использованием смолы Ринка и Fmoc-защищенных аминокислот. Структуру полученных олигопептидов подтверждали методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Для характеристики мембранотропных и таргетных свойств олигопептидов использовали моноламеллярные липосомы на основе фосфатидилхолина, полученные методом гидратации тонкой пленки.

Установлено, что амфифильные конъюгаты обладают мицеллообразующими свойствами с критической концентрацией мицеллообразования 63 мкМ (RGD) и 230 мкМ (GHK). Анализ липосомальных композиций в буфере HEPES методом динамического рассеяния света показал, что везикулы имеют размер около 100 нм. Модификация липосом пептидом RGD снижала дзета-потенциал системы на 2,7 мВ, пептидом GHK — повышала дзета-потенциал на 4,2 мВ, а композицией пептидов RGD и GHK — снижала дзета-потенциал на 2,3 мВ без значительного изменения гидродинамического диаметра.

Модификация пептидами повышала цитотоксичность липосом, загруженных доксорубицином, в отношении клеточной линии рака предстательной железы (PC-3). Липосомы, модифицированные композицией пептидов RGD и GHK, обладали наибольшей противоопухолевой активностью по сравнению с контрольной формулировкой без пептидов. По данным МТТ-теста значение IC_{50} составило 0,44 мкМ.

Полученные результаты могут быть использованы для создания и оптимизации таргетных систем доставки противоопухолевых лекарств на основе амфифильных пептидов RGD и GHK.

© В. А. Николаева, М. Зухайб, Р. В. Павлов, Г. А. Гайнанова, Р. И. Гарифуллин, Т. И. Абдуллин, 2021

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №20-73-10105 и в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИМФОТРОПНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПРИ СТАРЕНИИ

К. М. Николайчук [1], М. С. Федотова [1], О. В. Горчакова [2]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*

E-mail: k.nikolaichuk@g.nsu.ru

Аннотация

В рамках нового направления — лимфонутрициологии — разработана технология создания фитосредств (биоактивных добавок к пище) с лимфотропным эффектом действия. В эксперименте доказано влияние фитосредства как элемента функционального питания на морфофункциональный статус регионарных лимфоузлов, претерпевших старческие изменения. Прием фитосредства приводит к структурной модификации лимфоузлов, обеспечивая повышение дренажной и иммунной функций.

Рост экспериментальных и клинических исследований в области питания позволил интегрировать между собой нутрициологию и лимфологию с созданием новой, пограничной области знаний — лимфонутрициологии. Это позволяет создавать лимфотропные средства и по-новому подойти к оздоровлению организма. Прежде всего это касается лиц пожилого и старческого возраста, у которых имеет место возрастная деградация структур лимфатической системы: происходит замещение лимфоидной ткани на соединительную или жировую, формируется дефицит микроэлементов со снижением активности ферментов, наблюдается снижение клеточной пролиферации при утрате лимфоид-микроэлементной ассоциации. Все это обусловливает снижение функций лимфоузлов, что увеличивает риск развития возраст-ассоциированной патологии.

Для повышения функциональной активности лимфатической системы разработана технология создания фитокомпозиции, включающей измельченные лекарственные растения Сибири и компаунд пищевых волокон. Основной выбор сделан в пользу растительной компоненты, так как, во-первых, именно она чаще всего входит в состав биоактивных добавок к пище и пищевых продуктов; во-вторых, основным биоктивным веществом являются биофлавоноиды и микроэлементы растений, обладающих широким терапевтическим действием, что предполагает оздоровление эндоэкологической среды организма, особенно в старческом возрасте.

Применение фитосбора как элемента функционального питания привело к следующим позитивным эффектам: 1) лимфостимулирующему эффекту, приводящему к увеличению скорости пассажа лимфы через лимфоузел в 1,3–1,5 раза; 2) эффекту структурной модификации, которая выражается в избирательном увеличении или уменьшении размеров структурно-функциональных зон у старых животных с восстановлением размерности компартментов лимфоузла; 3) реализации принципа лимфопротекции за счет усиления функции экскреторных органов, что снижает токсический прессинг на лимфатическую систему; 4) впервые в результате фитостимуляции отмечен лимфопролиферативный эффект, проявляющийся образованием лимфоидных узелков за пределами и внутри лимфоузла, компенсирующих утрату иммунной функции периферических лимфоидных органов; 5) эффекту донорства микроэлементов растениями, позволяющему восполнить микроэлементный дефицит.

Таким образом, лимфотропная технология функционального питания на основе биофлавоноидов растений приводит к усилению дренажно-детоксикационной и иммунной функций лимфоузлов, подверженных старческим изменениям. Лимфотропное фитосредство способно скорректировать структуру лимфоузлов и открывает реальную перспективу борьбы с возраст-ассоциированным преждевременным старением органов и систем с реализацией эффекта через лимфатическую систему.

© К. М. Николайчук, М. С. Федотова, О. В. Горчакова, 2021

STUDY ON THE INFLUENCE OF SODIUM LAURYL SULFATE ON GELATIN-TANNIN HYDROGELS

K. O. Osetrov, M. V. Uspenskaya

ITMO University, St. Petersburg

E-mail: ko_osetrov@itmo.ru

Abstract

The synthesis of gelatin-tannin hydrogels modified by sodium lauryl sulfate is presented. The modifier concentration effect is demonstrated by methods of thermal analysis and IR-spectroscopy. Kinetic study shows change in swelling behavior of hydrogels followed by lauryl sulfate addition.

Hydrogel materials have found a pretty wide application in many areas [1]. These materials need to provide different properties regarding to their function. It must be biocompatibility, antimicrobial resistance and high hydrophility to act as biomaterial.

The main background for obtaining such materials is appropriate selection of polymer and type of the crosslinking. The formation of polymer network by the reaction of gelatin and tannin is quite challenging. However, that could bring a lot of benefits. In that way, gelatin provide structure similar to extracellular matrix, tannin act as antiseptic agent. The crosslinking reaction of that precursors was studied previously [2].

Hydrogels need to contain medicaments to find usage for medical purposes. Incorporating drug into highly crosslinked structure may find some limitations. One of the main properties of polymer network is crosslinking density and, related to it, mesh size. That parameters restrict maximum size of drug molecule.

The synthesized materials of gelatin and tannin demonstrated relatively low mesh size of the network. The existing technology needs to be optimized to expand possible application of that materials.

Inclusion of surfactant have major potential for that goal. Usage in low concentrations allows to increase mesh size and alter release rate of remedy [3]. Anionic surfactants, like sodium lauryl sulfate, modifies the structure by attaching to hydrophobic parts and changing distribution of charges density.

In current study, authors display possibility of obtaining gelatin and tannin hydrogels, modified by sodium lauryl sulfate. The surfactant effect is determined regarding to sorption, thermal properties and structure. Considered concentrations ($0.6/1.2/1.8 \cdot 10^{-3}$ w/w %) let to control network characteristics.

References

1. Fan H., Gong J. P. Fabrication of Bioinspired Hydrogels: Challenges and Opportunities // Macromolecules. 2020. Vol. 8. P. 2769–2782.

2. Осетров К. О., Успенская М. В., Стрельникова И. Е. Получение и исследование сорбционных характеристик таннин-желатиновых гидрогелевых материалов // Химическая промышленность сегодня. 2020. Т. 6. С. 58–61.

3. Pereira T. A., Ramos D. N., Lopez R. F. V. Hydrogel increases localized transport regions and skin permeability during low frequency ultrasound treatment // Scientific Reports. 2017. Vol. 9. P. 1–10.

© K. O. Osetrov, M. V. Uspenskaya, 2021

MODELING OF DIFFUSION PROCESSES IN 3D BIOPRINTED TISSUES WITH FUNCTIONAL REPRESENTATIONS AND FINITE ELEMENT METHOD

K. A. Pakhomova [1,3], B. A. Kirillov [2,3], A. A. Pasko [1,3], I. Sh. Akhatov [1]

[1] *CDMM, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[2] *CLS, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[3] *Spheroid Revolution LLC, Moscow*

E-mail: Catherine.Pakhomova@Skoltech.ru

Abstract

The paper proposes a non-invasive approach to control the quality of spheroids and their viability. The purpose of the work is to develop a tool for analyzing the viability of cells inside the spheroid, predicting the fusion of spheroids, and in the future, accurately modeling complex heterogeneous biostructures, which will significantly accelerate the development of such a promising field of additive biotechnology as 3D bioprinting.

Additive biotechnologies combine medical 3D printing and creating constructs (e. g., tissues, whole organs) from living cells. The current study concentrates on bioprinting — 3D printing using cells within hydrogel as filament. The main subject of contemporary research in bioprinting is heterogeneous structures since such is the structure of most human organs. This field of study poses several requirements for a mathematical model of constructs.

The complexity of 3D printing using living cells as filament requires mathematical modeling on the level of experimental design starting from the structural elements of technology, tissue spheroids — three-dimensional cell cultures, multicellular aggregates in a hydrogel. The spheroids can fuse into tissues via the tension forces, which is the main reason for their use in bioprinting. The classic method of growing multicellular spheroids is the "hanging drop" method, which creates a hydrogel drop with the cells in a wet mount. Unfortunately, this method is notoriously hard to reproduce, and the resulting cell culture quality can vary significantly.

Crucial parameters for quality control in spheroids are geometric characteristics and the viability of cells. The viability of cells depends on access to oxygen and nutrients, which is limited, especially for cells at the structure center. Lack of regeneration until the successful implantation of a completed construct leads to the emergence of necrotic regions, which renders the spheroids unacceptable for experiment or production.

We propose a non-invasive approach to control the quality of spheroids and their fusion into a complex bioconstruct. The method unites the nutrient concentration change calculations using Fick's law and the "reaction-diffusion" Poisson equations with specifying the exact fusion geometry using Functional Representations (FRep) for volumetric modeling. The proposed approach allows us to analyze the viability of cells within the spheroid and predict the fusion of spheroids into complex structures. Therefore, these results will significantly accelerate the development of 3D bioprinting.

© K. A. Pakhomova, B. A. Kirillov, A. A. Pasko, I. Sh. Akhatov, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЧНОСТИ СИНТЕЗА ДНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ *

И. М. Переверзев, К. И. Яковлева, А. А. Кечин, И. С. Довыденко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: pereverzevi1994@mail.ru

Аннотация

Проведено сравнение синтетических олигонуклеотидов, полученных от разных синтетических групп. Проведено сравнение доли олигонуклеотидов с корректной последовательностью и проанализирована структура ошибок. Предложены методы увеличения доли фрагментов ДНК с целевой последовательностью за счет оптимизации протоколов синтеза олигонуклеотидов и использования эндонуклеазы, распознающей сайты с неспаренными основаниями — CorrectASE™.

Синтез генных конструкций имеет большое значение для современной молекулярной биологии и генной инженерии, поскольку он позволяет синтезировать ДНК заданной последовательности *de novo*. Сборка генных конструкций происходит методами полимеразной или лигазной циклической сборки из олигонуклеотидов. Ранее было показано, что причиной большей части ошибок в синтетических генных конструкциях являются ошибки в исходных олигонуклеотидах [1]. Таким образом, для снижения ошибочности синтетических генных конструкций необходимо, в первую очередь, использовать для сборки олигонуклеотиды с минимальным числом ошибок.

Пáры олигонуклеотидов от 12 различных производителей, синтезированные твердофазным амидофосфитным методом, были достроены фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* до коротких дуплексов. Далее полученные после элонгации фрагментом Кленова короткие комплексы ДНК были секвенированы методом NGS с использованием платформы Illumina MiSeq с длиной прочтения 150 нт. Исходя из данных NGS, была рассчитана доля правильных прочтений, средняя вероятность ошибки, определена структура ошибок. Исходя из полученных данных была проведена оптимизация собственных протоколов твердофазного олигонуклеотидного синтеза для приборов отечественного производства ASM-800 и ASM-2000. Полученные олигонуклеотиды также были охарактеризованы методом NGS, полученные данные свидетельствовали о высоком содержании корректных молекул.

Для проверки возможности снижения числа ошибок в собираемой генной конструкции была проведена обработка дуплексов, достроенных фрагментом Кленова, эндонуклеазой, распознающей сайты с неспаренными основаниями, — CorrectASE™. Дуплексы, обработанные CorrectASE™, также были секвенированы методом NGS. На основе сравнения результатов секвенирования образцов до и после обработки CorrectASE™ было показано увеличение доли корректных дуплексов во всех образцах.

Литература

1. Шевелев Г. Ю., Переверзев И. М., Кечин А. А. и др. Коррекция ошибок при ферментативной сборке протяженных последовательностей ДНК // Биотехнология — медицине будущего: Материалы всероссийск. мультиконф. с междунар. участием, Новосибирск, 29 июня — 2 июля 2019 года. Новосибирск: Офсет-ТМ, 2019. С. 91.

© И. М. Переверзев, К. И. Яковлева, А. А. Кечин, И. С. Довыденко, 2021

* Работа выполнена при финансировании ГЗ (№ 0245-2019-0002).

ШТАММ *STREPTOMYCES* SP. IB2019K190-4, КУЛЬТИВИРОВАННЫЙ НА СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ ОТХОДЫ ЛЕСОПИЛЕНИЯ, КАК ПРОДУЦЕНТ ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ *GLACIAPYRROL B.* *

Е. В. Переляева, М. Е. Краснова, Н. А. Имидоева,
М. М. Моргунова, А. Ю. Белышенко, Т. Ю. Тельнова, Д. В. Аксенов-Грибанов

Иркутский государственный университет

E-mail: cat.perelyaeva@gmail.com

Аннотация

В ходе проведенных экспериментов показано, что актинобактерии рода *Streptomyces* способны не только расти на трудноразлагаемых отходах, но и синтезировать при этом биологически активные метаболиты, что представляет особую ценность для современной биофармацевтики и медицины.

Одной из главных проблем XXI века является переработка трудноразлагаемых отходов. Перспективным способом их утилизации может выступать биологическая деструкция [1]. Целью данного исследования являлась оценка способности актинобактерий синтезировать природные соединения при росте на отходах лесопиления. Для культивирования и скрининга природных соединений был выбран штамм *Streptomyces* IB2019K190-4.

Данный штамм культивировали на твердой питательной среде с градиентным (увеличивающимся) содержанием в среде отходов лесопиления. Для оценки биотехнологического потенциала выделенных актинобактерий использовали метод хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и дерепликации соединений с помощью базы данных Dictionary of Natural Products. Помимо этого, был проведен анализ антибиотической активности экстрактов *Streptomyces sp.* IB2019K190-4, культивированного на питательной среде, содержащей отходы лесопиления с помощью диско-диффузионного метода. В качестве тест-культур были выбраны бактерии *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas putida*.

В ходе проводимого исследования установлено, что при культивировании на питательной среде, содержащей опилки хвойных пород, штамм *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 способен синтезировать не менее 12 природных соединений. По крайней мере 4 из 12 выявленных природных соединений являются новыми и не зарегистрированы в базе данных DNP.

В экстракте штамма *Streptomyces* sp. IB2019K190-4, культивированного на среде, содержащей сосновые опилки, было идентифицировано природное соединение Glaciapyrrol B с *m/z* 317,199.

Вместе с тем были проанализированы хроматограммы масс экстрактов, полученных в результате культивирования штамма *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 на питательной среде, содержащей березовые опилки. В данных экстрактах было обнаружено 22 природных соединения, 12 из которых являются новыми. Соединение, синтезируемое штаммом *Streptomyces* sp. IB2019K190-4, в условиях содержания в питательной среде сосновых опилок и идентифицированное как Glaciapyrrol B, также не было обнаружено.

Таким образом, на примере штамма *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 показано, что отходы лесопиления могут быть использованы в качестве компонента питательных сред, необходимого для синтеза как известных, так и новых природных соединений с биологической активностью. Соединение, идентифицированное как Glaciapyrrol B относится к пирролсесквитерпеноидам и обладает антибиотической активностью против *B. subtilis* и *Micrococcus luteus* [2]. В подтверждение данного факта проведение анализа антибиотической активности экстрактов, содержащих Glaciapyrrol B, показало ее наличие против тестовой культуры *B. subtilis*. Таким образом, полученные известные и неизвестные соединения представляют особую ценность для современной биофармацевтики и медицины.

Литература

1. Chauhan P. S. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 23. P. 1–19.

2. Flora D. O. et al. Himalomycin A and cycloheximide-producing marine actinomycete from Lagos Lagoon soil sediment // Journal of Coastal Life Medicine. 2015. Vol. 3. № 5. P. 361–365.

© Е. В. Переляева, М. Е. Краснова, Н. А. Имидоева, М. М. Моргунова, А. Ю. Белышенко, Т. Ю. Тельнова, Д. В. Аксенов-Грибанов, 2021

* Исследование проведено при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (18-29-05051) и фонда имени Г. Комиссарова.

ПЕРОРАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ЭРИТРОПОЭТИНА

Т. Е. Петухова

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

E-mail: tanja-petuhova@yandex.ru

Аннотация

Эритропоэтин является гликопротеином и относится к группе цитокинов I класса, поддерживающих жизнеспособность и пролиферацию кроветворных клеток. Являясь основным регулятором эритропоэза, эритропоэтин стимулирует образование эритроцитов из поздних клеток-предшественников и повышает выход ретикулоцитов из костного мозга. В настоящее время препараты эритропоэтина производятся различными фармацевтическими фирмами в девяти видах (альфа, бета, гамма, дельта, эпсилон, каппа, омега, тета и дзета). Несмотря на то что на фармацевтическом рынке зарегистрировано около 12 препаратов, поиски и разработка более эффективных и безопасных препаратов продолжается.

Все зарегистрированные на фармацевтическом рынке препараты рекомбинантного эритропоэтина (ЭПО) вводятся парентерально. Многолетнее использование препаратов эритропоэтина при различных заболеваниях свидетельствует о том, что они являются хорошо переносимыми фармакологическими средствами, которые практически не имеют побочных эффектов. Однако применение препаратов рекомбинантного эритропоэтина позволило выявить при традиционном способе получения ряд недостатков.

Создание новой формы рчЭПО для перорального применения позволяет решить ряд проблем, связанных с назначением и контролем приема препарата. Поскольку пероральная форма легко дозируется, это поможет избежать передозировки гормона при лечении и не потребует привлечения квалифицированного медицинского персонала, пациент самостоятельно сможет принимать препарат. Пероральная форма препарата позволит предотвратить резкое одномоментное повышение концентрации гормона в крови, а также снизить количество побочных эффектов.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработаны три формы рчЭПО для перорального применения (таблетированная, капсулированная, нанокапсулированная).

Таблетированная форма рекомбинантно человеческого эритропоэтина

Препарат рекомбинантного человеческого эритропоэтина представляет собой сладкие таблетки двояковыпуклой формы со вкусом и запахом ванилина. Входными воротами для гормона при терапии является слизистая оболочка полости рта, глотки и тонкого кишечника. Специально подобранный состав стабилизаторов и наполнителей позволяет исключить побочные эффекты, вызываемые добавками.

Нанокапсулированная форма рекомбинантного эритропоэтина человека

Нанокапсула представляет собой наночастицу, состоящую из полимерной оболочки, окружающей ее содержимое. Технология капсулирования заключается в коацервации ЭПО в водном растворе полимера с введением стабилизаторов и последующим лиофильным высушиванием. Нанокапсулы обладают высокой проникающей способностью. Малый размер делает их невидимыми для клеток иммунной системы, что позволяет нанокапсулам длительное время циркулировать в кровотоке. Использование нанокапсул исключает наработку аутоантител организмом, что повышает безопасность использования лекарственных препаратов.

Вектор-рчЭПО, рекомбинантный эритропоэтин человека, *капсулы для приема внутрь*

Препарат «Вектор — рчЭПО», представляет собой рекомбинантный эритропоэтин человека, полученный при культивировании линии клеток CHOpE — продуцента генно-инженерного эритропоэтина в питательной среде, высушенного со стабилизатором и полимером и внесенного в твердые желатиновые капсулы.

Разработанные ФБУН ГНЦ ВБ Вектор пероральные формы рчЭПО имеют ряд преимуществ перед инъекционными формами:

– простота введения;

– отсутствие осложнений, характерных для парентерального введения;

– отсутствие одномоментного резкого повышения концентрации препарата в крови в сравнении с физиологической нормой;

– пролонгированное действие лекарства;

– снижение раздражения слизистой желудка, высвобождение лекарственного агента в необходимом участке желудочно-кишечного тракта или органе-мишени.

В дальнейшем будет проведена сравнительная характеристика препаратов рчЭПО для перорального применения и выбрана наиболее перспективная форма.

© Т. Е. Петухова, 2021

ДИЗАЙН МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ*

В. К. Попова, А. А. Ломзов, Е. В. Дмитриенко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

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

Аннотация

Создание многопараметрических систем доставки биологически активных веществ — актуальная ниша современных биомедицинских исследований на протяжении нескольких десятков лет ввиду фундаментальных сложностей решения этой задачи. Нами предложен подход к конструированию многопараметрических систем доставки на основе наночастиц (НЧ), противоопухолевого антибиотика доксорубицина (DOX) и/или олигонуклеотидов. Разработаны протоколы синтеза НЧ на основе карбоната кальция (CaНЧ) или диоксида кремния (SiНЧ). Продемонстрирована эффективность взаимодействия полученных НЧ с DOX. Показано пролонгированное pH-зависимое высвобождение DOX из наноносителей и эффективность ингибирования роста линий раковых клеток композитами на основе НЧ, несущих доксорубицин (CaНЧ-DOX и SiНЧ-DOX) в моделях *in vitro*. Разработан подход функционализации поверхности НЧ, разрешающий дальнейшую пришивку нацеливающих олигонуклеотидных векторов, в том числе структурированных конструкций, применимых для дальнейшего поиска специфичных белковых фрагментов.

Благодаря стремительному развитию и синергии молекулярной биологии, нанотехнологии и биоорганической химии в последнее десятилетие активно развиваются стратегии доставки биологически активных веществ (БАВ), позволяющие использовать минимально необходимые дозы препарата для получения максимума терапевтического эффекта.

Одна из распространенных стратегий создания систем доставки БАВ — подход «слой за слоем», включающий последовательное покрытие твердотельного носителя функционализирующими покрытиями, которые придают системе адресность и/или увеличенное время циркуляции в организме, отвечают за детекцию системы *in vivo*. Целью данной работы является разработка методов создания функциональных многопараметрических систем доставки БАВ для биомедицинских применений. В рамках этого разработаны методы синтеза и функционализации наноматериалов, пригодных для применения *in vivo,* и осуществлена их аппробация с использованием лекарственного средства (доксорубицин, DOX) и модельных олигонуклеотидов для нужд тераностики и решения задач фундаментальных исследований, соответственно.

В качестве основы систем доставки БАВ выбраны наночастицы (НЧ) на основе карбоната кальция (CaНЧ) и диоксида кремния (SiНЧ). Разработаны протоколы синтеза НЧ с гидродинамическим размером до 200 нм. Исследована эффективность взаимодействия CaНЧ и SiНЧ с противоопухолевым антибиотиком широкого спектра — DOX. Показана высокая эффективность связывания, равная 659 ± 5 мкг DOX на 1 мг CaНЧ и менее выраженная для SiНЧ — 132 ± 8 мкг/мг. Установлено pH-зависимое пролонгированное высвобождение DOX из комплекса с НЧ. Доказана эффективность ингибирования роста клеток линии A549 конструкцией НЧ — DOX, сопоставимая с действием свободного DOX, в диапазоне терапевтических концентраций DOX 0,1–10 мкМ.

Исследована возможность модификации поверхности НЧ для дальнейшего расширения функциональности системы. Исследована возможность придания НЧ адресности *in vivo* путем покрытия поверхности транспортера разветвленным полимером — нейлоном-6 — и дальнейшей иммобилизации модельных олигонуклеотидов. Изучена возможность использования модифицированных нейлоном-6 НЧ для структурно-специфического выделения белков из клеточного лизата и проведено сопоставление эффективности выделения таких белков в сравнении с коммерчески доступными магнитными частицами. Результаты проведенных исследований показывают высокий потенциал дальнейшего применения CaНЧ и SiНЧ для решения задач фундаментальных исследований и биомедицинских целей.

© В. К. Попова, А. А. Ломзов, Е. В. Дмитриенко, 2021

* Работа выполнена при поддержке базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН №121031300042-1, РФФИ 20-04-00719 и РНФ 21-74-00120.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ*

Д. В. Попыванов

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого, Киров

E-mail: 1fast@mail.ru

Аннотация

Способность мицелия базидиальных грибов формировать трехмерные структуры, связывая растительные частицы субстрата в единое целое, представляет серьезный интерес для практического использования этого свойства грибного мицелия. Биополимерные материалы на основе мицелия базидиомицетов (микополимеры) способны частично заменить пенопласты благодаря схожим физико-химическим свойствам.

Одной из актуальных экологических проблем является загрязнение окружающей среды пластиковыми отходами. Длительный период разложения, выделение токсичных веществ в процессе использования пластиковых изделий, сложности с переработкой полимерных отходов обуславливают поиск более экологичного материала с похожими свойствами.

Производство композитов из мицелия грибов в последние годы вызывает все больший коммерческий и научный интерес. Благодаря своей способности перерабатывать растительные и древесные отходы в недорогие, устойчивые композитные материалы базидиальные грибы являются перспективным объектом биотехнологии.

Имеющиеся данные о физических свойствах микополимеров из некоторых видов базидиомицетов, свидетельствуют о близости этих материалов к строительным пенам. Хитин, входящий в состав клеток мицелия, благодаря водородным связям вдоль цепей углерода, обладает значительно большей прочностью на растяжение, чем многие созданные материалы, такие как углеродные волокна и сталь. Исследования биополимеров из мицелия грибов на теплопроводность показывают значения в пределах 0,05–0,07 Вт/(м·К), что позволяет использовать этот биоразлагаемый материал в целях теплоизоляции вместо полимерных утеплителей. Кроме того, отмечена способность микополимеров поглощать акустические волны с эффективностью 70–75 % при частоте 1кГц. Исследованные свойства позволяют применять композиты из мицелия в качестве строительных материалов, упаковки и элементов декора. Существенными преимуществами материала на основе мицелия базидиальных грибов являются более низкие энергозатраты на производство, дешевое сырье и отсутствие в составе токсичных веществ.

В России в настоящее время микополимеры не производятся. Сложности возникают из-за отсутствия сведений о перспективных штаммах базидиомицетов, образующих высокопрочные биополимеры.

На базе лаборатории молекулярной биологии и селекции проводятся исследования по поиску перспективных штаммов базидиомицетов, распространенных на территории Кировской области. Местные штаммы грибов лучше адаптированы к природным субстратам за счет специфического набора ферментов, что позволяет ускорить



Биополимерные блоки из мицелия грибов: *Phellinus igniarius* (слева) и *Ganoderma applanatum* (справа). Субстрат — опил березы и рожь в соотношении 3 : 0,5

© Д. В. Попыванов, 2021

*Исследования выполнены при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» договор № 16233ГУ/2021.

процесс зарастания субстрата и снизить риск контаминации конкурирующими организмами. В чистую культуру выделены штаммы *Ganoderma applanatum*, *Laetiporus sulphureus*, *Fomes fomentarius, Phellinus igniarius.* В целях исследования физико-механических свойств микополимеров на основе местных штаммов базидиальных грибов проводится изучение роста базидиомицетов на различных субстратах, включающих опил лиственных и хвойных пород деревьев с добавлением соломы, зерна и отрубей злаковых культур (см. рисунок).

Подбор оптимального состава субстрата и выделение продуктивного штамма гриба позволит производить биополимеры из возобновляемого сырья с требуемыми физико-механическими свойствами. Использование в производстве древесных и растительных отходов уменьшит нагрузку на окружающую среду.

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ МОЛОКА ЛОШАДИ — ПЕРСПЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ*

Л. В. Пурвиньш[1,2], А. И. Ситникова[1], С. Е. Седых[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: sedyh@niboch.nsc.ru

Аннотация

Известно, что внеклеточные везикулы играют важную роль в межклеточной коммуникации, переносят нуклеиновые кислоты и другие регуляторные и сигнальные молекулы. Экзосомы молока могут быть получены в промышленных масштабах, поэтому они являются перспективными средствами направленной доставки лекарственных препаратов. В данной работе определены пептиды и белки экзосом молока лошади на разных стадиях выделения.

Экзосомы — это природные нановезикулы диаметром 40–100 нм, которые содержатся в различных биологических жидкостях. Известно, что экзосомы молока содержат различные нуклеиновые кислоты, белки и пептиды. Эти природные компоненты экзосом могут играть важную роль в случае использования экзосом молока в качестве средств адресной доставки лекарственных препаратов. В связи с этим анализ белков и пептидов, содержащихся в экзосомах молока, является актуальной задачей.

Для выделения экзосом из молока использовали протокол, который включал в себя несколько стадий центрифугирования на низких оборотах, ультрафильтрацию через фильтр 0,22 мкм, ультрацентрифугирование на 100000×g и гель-фильтрацию на сорбенте Ultrogel A4.

Во фракциях молока лошади, полученных на различных этапах выделения экзосом, определили содержание природных пептидов методом MALDI TOF MS/MS и белков методом LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов.

Протеомный анализ показал, что высокоочищенные препараты экзосом лошадиного молока не содержат совыделяющихся примесей таких белков, как казеины, лактальбумин, сывороточный альбумин, что позволяет отнести данные белки к «отрицательным» маркерам экзосом молока. Известно, что эти белки обуславливают пищевую аллергию у человека, что указывает на возможность и необходимость получения высокоочищенных препаратов экзосом для адресной доставки лекарственных препаратов.

© Л. В. Пурвиньш, А. И. Ситникова, С. Е. Седых, 2021

* Работа поддержана грантом РНФ 18-74-10055 (рук. С. Е. Седых).

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ТЕЛОК ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ В ВОЗРАСТЕ 12 МЕСЯЦЕВ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕВОГО БИОСТИМУЛЯТОРА

И. А. Пушкарев [1], А. И. Афанасьева [2]

[1] *Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул*
[2] *Алтайский государственный аграрный университет, Барнаул*

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

Аннотация

Представлены результаты исследований, целью которых являлось изучение уровня неспецифической резистентности телок черно-пестрой породы в возрасте 12 месяцев на фоне применения тканевого биостимулятора. Оптимальной дозой и схемой введения тканевого биостимулятора, способствующей повышению показателей спонтанного НСТ-теста на 7,6 % ($p \leq 0,05$), стимулированного НСТ-теста на 11,2 % ($p \leq 0,05$) и фагоцитарной активности нейтрофилов 5,4 % ($p \leq 0,001$) является 3,0 мл/голову с 1 по 5 месяц, 6,0 мл/голову с 6 по 11 месяц и 15,0 мл/голову в 12 месячном возрасте соответственно.

Введение

Следует отметить, что в период выращивания животных на их организм оказывают негативное влияние разнообразные факторы окружающей среды, которые способствуют снижению естественной резистентности и, как следствие, повышению числа случаев заболеваемости [1, 2].

Отмечено, что при применении тканевых препаратов существенно повышается иммунный статус за счет увеличения лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови, повышения функциональной активности нейтрофилов, увеличения содержания в крови Т- и В-лимфоцитов [3, 4].

В связи с этим целью наших исследований являлось изучение показателей, характеризующих неспецифическую резистентность организма телок черно-пестрой породы в возрасте 12 месяцев на фоне применения тканевого биостимулятора.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены в период с 2020 по 2021 г. на ремонтном молодняке крупного рогатого скота. По принципу пар-аналогов сформировали 4 подопытные группы телочек по 10 голов в каждой. Тканевый биостимулятор вводился животным опытных групп с 1 по 12 месяцы выращивания ежемесячно с интервалом 30 дней по схемам: I опытной группе с 1-го по 5-й месяц — 2,0 мл/гол., с 6-го по 11-й мес. — 4,0 мл/гол., в 12-й мес. — 8,0 мл/гол.; II опытной группе с 1-го по 5-й месяц — 3,0 мл/гол., с 6-го по 11-й мес. — 6,0 мл/гол., в 12-й мес. — 15,0 мл/гол.; III опытной группе с 1-го по 5-й мес. — 4,0 мл/гол., с 6-го по 11-й мес. — 8,0 мл/гол., в 12-й мес. — 16,0 мл/гол. Животным контрольной группы инъецировали физиологический раствор с 1-го по 5-й месяц в дозе 3,0 мл/гол., с 6-го по 11-й мес. — 6,0 мл/гол., в 12-й мес. — 15,0 мл/гол. Отбор проб крови для иммунологических исследований проводился в возрасте 12 месяцев и на 14-й день после инъекции препарата.

Результаты исследований и их обсуждения

Исследования показали, что введение тканевого биостимулятора способствовало увеличению показателя спонтанного НСТ-теста, отражающего метаболический потенциал клеток, способных к фагоцитозу, у 12-месячных телок в I опытной группе на 4,0 %, во II — на 8,0 % ($p \leq 0,05$) и в III — на 6,0 % ($p \leq 0,05$), в сравнении с аналогами контрольной группы.

Изучение значений стимулированного НСТ-теста, позволяющего оценить состояние кислород-зависимого механизма бактерицидной активности фагоцитов, показало, что использование тканевого препарата повышает его уровень на 3,1 ($p \leq 0,05$), 4,7 % ($p \leq 0,05$) и 6,3 % ($p \leq 0,01$), соответственно, у животных I–III опытных групп в сравнении с показателями, установленными у контрольной группы животных.

Фагоцитарный индекс крови, отражающий поглотительную способность фагоцитов, ремонтного молодняка опытных групп превосходил на 0,4–3,0 % ($p \leq 0,05$) аналогичный показатель у животных контрольной группы.

У 12-месячных телок черно-пестрой породы введение тканевого биостимулятора способствовало повышению показателей спонтанного НСТ-теста. На 14-й день после инъекции установлено его увеличение на 3,8; 7,6 % ($p \leq 0,05$) и 5,7 % соответственно у животных I–III опытных групп в сравнении с контрольными животными. Необходимо отметить, что наиболее оптимальной оказалась схема применения препарата у II опытной группы животных.

© И. А. Пушкарев, А. И. Афанасьева, 2021

Исследованиями установлено, что введение тканевого биостимулятора способствовало увеличению показателя стимулированного НСТ-теста у животных опытных групп на 1,4–3,0 % ($p \leq 0,01$). У телок опытных групп показатели стимулированного НСТ-теста были выше на 6,4 ($p \leq 0,05$), 11,2 ($p \leq 0,01$) и 9,6 % ($p \leq 0,05$) соответственно, чем у аналогов контрольной группы.

В сравнении с животными контрольной группы, у 12-месячных телок I, II и III опытных групп фагоцитарный индекс нейтрофилов увеличился на 1,8; 5,4 ($p \leq 0,001$) и 4,6 % ($p \leq 0,01$) соответственно.

Полученные в нашем опыте результаты согласуются с исследованиями других авторов [5, 6].

Литература

1. Windeyer M. C., Leslie K. E., Godden S. M. et al. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age // Preventive Veterinary Medicine. 2014. Vol. 2. P. 231–240.

2. Omontese B. O., Caixeta L. S., Machado V. S. et al. Effects of the Administration of a Non-specific immune Stimulant Around Transportation on Health and Performance of Jersey and Jersey-Cross Heifer Calves During the Rearing Period: Randomized Clinical Trial // Frontiers in Veterinary Science. 2020. Vol. 7. 550202.

3. Соколова Е. С., Еремин С. П., Яшин И. В. Биохимический гомеостаз у коров под влиянием тканевых препаратов // Вестник Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. Т. 3. С. 441–443.

4. Li X., Su Y., Sun J. et al. Chicken embryo extracts enhance spleen lymphocyte and peritoneal macrophages function // J. Ethnopharmacol. 2012. Vol. 144(2). P. 255–260.

5. Топурия Г. М., Топурия Л. Ю. Иммунный статус крупного рогатого скота при применении Гамавита // Известия Оренбурского государственного аграрного университета. 2011. Т. 1. С. 69–71.

6. Блохин П. И. Влияние препарата «Био-ТЭК» на биохимические показатели крови коров и полученных от них телят // Труды КубГАУ. 2011. Т. 73(09). С. 2–9.

НОВЫЕ ЛАККАЗЫ АСКОМИЦЕТОВ, АКТИВНЫЕ В НЕЙТРАЛЬНО-ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЕ*

Ж. В. Ренфельд, А. М. Черных, Н. М. Мясоедова, А. Д. Егорова,
А. С. Гайдина, Б. П. Баскунов, М. П. Коломыцева

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

E-mail: zhanna.renfeld@yandex.ru

Аннотация

Алкалофильные грибные лакказы обладают огромным потенциалом применения в различных областях биотехнологии, однако число выделенных и охарактеризованных алкалофильных грибных лакказ невелико. В настоящей работе были получены новые лакказы грибов рода *Myrothecium* и *Curvularia, наиболее активные с фенольными соединениями в нейтрально-щелочных условиях среды,* идентифицированы нуклеотидные последовательности генов, кодирующих данные лакказы и определено их филогенетическое родство. Показана способность лакказ катализировать *полимеризацию фенилпропаноидов с образованием продуктов, потенциально востребованных в фармацевтике.*

Лакказы (КФ 1.10.3.2, бензендиол: кислород оксидоредуктазы, «голубые» оксидазы) — это медьсодержащие оксидазы, катализирующие окисление множества фенольных соединений с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Грибные лакказы обладают более высоким редокс-потенциалом по сравнению с лакказами, выделенными из других организмов, и, соответственно, широкой субстратной избирательностью [2]. Поэтому данные ферменты востребованы во многих отраслях промышленности: для деградации поллютантов в промышленных сточных водах, обесцвечивания красителей, для синтеза или модификации широкого спектра соединений. Лакказы, наиболее активные в нейтрально-щелочных условиях среды, необходимы в ряде клеточных биотехнологий, осуществляемых в цитоплазме клетки (создание биотопливных ячеек имплантируемых приборов, клеточный синтез биоактивных соединений, нанобиотехнологии и биосенсоры) [1].

В результате обширного скрининга грибных продуцентов алкалофильных лакказ в ходе настоящей работы были отобраны два аскомицета — *Myrothecium roridum* и *Curvularia geniculata*. Была проведена оптимизация условий культивирования с использованием природных источников углерода и энергии, а также типичных индукторов лакказной активности, и получены гомогенные препараты алкалофильных лакказ. Охарактеризованы физико-химические и кинетические свойства выделенных ферментов. Полученные результаты позволили подтвердить максимальную активность исследованных лакказ при значении pH ≥ 7, а также их способность окислять фенилпропаноиды с образованием соединений полимерной природы, имеющих потенциал применения в фармацевтике. Получены полные нуклеотидные последовательности генов лакказ аскомицетов *M. roridum* и *C. geniculata* и определено их филогенетическое родство с генами ряда известных грибных лакказ.

Литература

1. Marienhagen J., Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. // J. Biotechnol. 2013. Vol. 163, P. 166–178.

2. Mate D. M., Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology // Microbial Biotechnology. 2017. Vol. 10. P. 1457–1467.

© Ж. В. Ренфельд, А. М. Черных, Н. М. Мясоедова, А. Д. Егорова, А. С. Гайдина, Б. П. Баскунов, М. П. Коломыцева, 2021

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-Аспиранты № 20-34-90059.

СОЗДАНИЕ АКТУАЛЬНОЙ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ, И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОИСКА СОЕДИНЕНИЙ, СПОСОБНЫХ БЛОКИРОВАТЬ ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИЧ-1 В КЛЕТКУ-МИШЕНЬ*

Н. Б. Рудометова[1], Н. С. Щербакова[1], А. А. Фандо[1,2], Д. Н. Щербаков[1], А. С. Соколова[3], О. И. Яровая[3], Н. Ф. Салахутдинов[3], Л. И. Карпенко[1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Новосибирский государственный университет*
[3] *Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

E-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Аннотация

Получена и охарактеризована панель *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 на основе изолятов рекомбинантной формы CRF63_02A и подтипа A6, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа. С использованием полученных *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 проведен анализ антивирусной активности библиотеки соединений и выявлен ряд соединений, способных блокировать проникновение псевдовирусов в клетку-мишень.

Технология *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 широко используется для оценки эффективности разрабатываемых вакцин и для поиска противовирусных препаратов (ингибиторов проникновения) против ВИЧ-1. Учитывая высокую генетическую изменчивость вируса, необходимо постоянно обновлять панели псевдовирусов в соответствии с появлением новых вариантов ВИЧ-1.

Целью работы является создание актуальной панели *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 на основе изолятов, циркулирующих на территории РФ, и ее использование для поиска соединений, способных блокировать проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень.

В результате проведенного исследования из образцов сывороток ВИЧ-инфицированных доноров Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасия была выделена суммарная РНК. С помощью обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции было получено 33 полноразмерных варианта гена *env* изолятов ВИЧ-1 и были определены их нуклеотидные последовательности. Филогенетический анализ показал, что 26 вариантов гена *env* относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A, а 7 вариантов — к подтипу A6. Анализ нуклеотидной последовательности V3-петли показал, что 31 вариант является CCR5-тропным, один вариант является CXCR4-тропным и один вариант обладает двойной тропностью R5/X4.

Путем клонирования гена *env* в составе экспрессионного вектора были получены генетические конструкции, несущие варианты полноразмерного гена *env* ВИЧ-1 (pEnv). Котрансфекция культуры клеток HEK293 плазмидами pEnv совместно с коровой плазмидой pSG3Δenv приводила к экспрессии вирусных белков и формированию псевдовирусных частиц. Функциональный анализ полученных вариантов псевдовирусов показал, что сборка функционально активных псевдовирусных частиц происходит для 13 вариантов псевдовирусов, среди которых 11 вариантов принадлежат к рекомбинантной форме CRF63_02A и два варианта к подтипу A6; все варианты псевдовирусов являются CCR5-тропными. Далее была определена чувствительность полученных псевдовирусов к нейтрализации широконейтрализующими антителами (bnAbs). Согласно результатам эксперимента, большинство псевдовирусов оказались чувствительными к нейтрализации bnAbs VRC01, PGT126 и 10E8; проявили умеренную чувствительность к bnAbs PG9 и 4E10 и оказались устойчивыми к bnAbs 2G12, PG16 и 2F5.

С использованием полученных псевдовирусов был проведен анализ антивирусной активности библиотеки соединений на основе природных терпеноидов и их производных, синтезированных и предоставленных лабораторией физиологически активных веществ Института органической химии (НИОХ СО РАН). По итогам проведенного анализа среди производных адамантана и глицирризиновой кислоты был выявлен ряд соединений, способных блокировать проникновение псевдовирусов. Дальнейшие исследования будут направлены на определение молекулярной мишени, на которую нацелены наиболее активные препараты, а полученные данные могут быть полезны для их проверки на натуральном вирусе ВИЧ-1.

© Н. Б. Рудометова, Н. С. Щербакова, А. А. Фандо, Д. Н. Щербаков, А. С. Соколова, О. И. Яровая, Н. Ф. Салахутдинов, Л. И. Карпенко, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научных проектов № 19-44-543013 и № 19-44-540008.

АНАЛИЗ И ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСТРУКТУР СЕРЕБРА КАК МЕТОД БОРЬБЫ С МИКОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ

В. В. Рябиков [1], Я. Д. Тимирбаева [1], С. В. Сергеенков [1], М. А. Мысин [2]

[1] *Пензенский государственный университет*
[2] *Пензенский государственный аграрный университет*

E-mail: VIINEL@yandex.ru

Аннотация

В статье кратко описаны результаты научно-исследовательской работы по разработке малотоксичных микроструктур серебра для борьбы с микологическими агентами растений.

Введение

Во все времена существовала проблема заражения растений фитопатогенными культурами грибов. Примерами могут служить микроскопические грибы. На данный момент в промышленных масштабах проблему заболеваний решают применением фунгицидов [1, 2]. К сожалению, многие фунгициды при неправильном применении оказываются малоэффективными или высокотоксичными. Также их применение в некоторых случаях негативно влияет на пчелиные семьи: пчелы могут погибнуть, их мед при использовании определенных фунгицидов становится токсичным [3].

Подобная проблема существует и в микроклональном размножении. Применяемые сегодня вещества являются высокотоксичными для клеточной культуры. Из-за этого требуется точно нивелировать время воздействия.

Литературный обзор

В статье [4] описывается следующий процесс воздействия серебра: как только на поверхности микробной клетки сорбируется серебро, оно проникает внутрь клетки и ингибирует ферменты дыхательной цепи, а также разобщает процессы окисления и окислительного фосфорилирования в микробных клетках, в результате чего клетка гибнет [4]. Исследования показали, что чувствительность разных патогенных и непатогенных организмов к серебру неодинакова. Патогенная микрофлора намного более чувствительна к ионам серебра, чем непатогенная [4]. При этом частицы серебра не могут проникнуть в клетку млекопитающего, поэтому сами частицы не представляют опасности для человека.

Но не стоит забывать о том, что, к примеру, при пероральном введении коллоидов серебра происходит уменьшение сродства гемоглобина к кислороду в условиях падения pH. Нарушение кислотно-щелочного баланса можно понимать как неблагоприятное воздействие серебра на почки [5].

Частицы серебра подвергаются окислительному растворению под действием окислителей (к примеру, кислорода). Высвобождение Ag+ приводит к созданию активных форм кислорода, которые еще больше ускоряют процесс растворения частиц. Факторами, ускоряющими растворение частиц, выступают: наличие редуцирующих сахаров, наличие естественного органического вещества [6], pH.

На сегодняшний день в литературе не описаны методы эффективного снижения токсичности частиц с сохранением их свойств в отношении фитопатогенов, а следовательно, и ионов на организм.

Результаты

Существует множество методов синтеза коллоидов серебра. Для наших целей был выбран химический синтез, основанный на восстановлении серебра из аммиаката, с образованием частиц серебра, глюконовой кислоты и аммиака. Таким методом были получены частицы сферической морфологии со средним диаметром 217,4 нм. Частицы исследованы методами зондовой микроскопии, а также электронной (УФ-) спектроскопии.

Предложенный метод ограничивания растворения частиц серебра в растворе был реализован путем первоначального растворения МКЦ в 12 % растворе NaOH при t = 4°. Такие условия обеспечивают лучшую растворимость МКЦ в растворе.

Осаждение целлюлозы на частицы проводилось путем нейтрализации щелочи. Наилучший результат был получен при t = 4° и использовании 30 % раствора уксусной кислоты.

По результатам работы были получены частицы общим размером около 317,5 нм.

© В. В. Рябиков, Я. Д. Тимирбаева, С. В. Сергеенков, М. А. Мысин, 2021

Литература

1. Тузов В. К., Калинченко Э. М., Рябинков В. А. Методы борьбы с болезнями и вредителями леса. М.: ВНИИЛМ, 2003. 112 с.

2. Репин Н. А. Характеристика фунгицидов различного состава // Материалы VI Междунар. студ. науч. конф. «Студенческий научный форум — 2014».

3. Гранкин Н. Н. и др. Влияние пестицидов на пчелиные семьи // Наука-2020: Современные тенденции в науке, технике, образовании. 2018. № 9(25). С. 53–57.

4. Букина Ю. А., Сергеева Е. А. Антибактериальные свойства и механизмы бактерицидного действия наночастиц серебра // Вестник Казанского технологического университета. 2012. С. 170–172.

5. Петрицкая Е. Н., Абаева Л. Ф., Рогаткин Д. А. и др. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении колодного раствора // Альманах клинической медицины. 2011. № 25.

6. Хо Чи-Мин, Самми Кинг-Ун Яу, Чун-Нам Лок и др. Окислительное растворение наночастиц серебра биологически соответствующими окислителями: кинетические и механические исследования // Chem. Asian J. Chemistry — An Asian Journal. 2010. № 5.2. С. 285–293.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ДНК-МИКРОЧИПА И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОГРАММАХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА В ЭТНИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ*

М. Т. Саввина, Н. Р. Максимова, А. Л. Сухомясова, А. Л. Данилова

Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Якутск

E-mail: mira@savv.in

Аннотация

В генетически изолированных популяциях, таких как якутская этническая группа, наблюдается накопление этноспецифических мутаций, которые являются причиной серьезных наследственных патологий, встречающихся в популяции с высокой частотой. Необходимо создание эффективного инструмента для проведения массового молекулярно-генетического скрининга, учитывающего, прежде всего, этнические особенности популяции. Предложен способ для быстрого одномоментного выявления наиболее распространенных в Якутии наследственных болезней моногенной природы. Оценены перспективы и эффективность применения разработки в практической медицине.

Во многих странах существуют генетически изолированные популяции. Вследствие популяционных механизмов в таких популяциях наблюдается высокое распространение наследственных заболеваний, вызванных мутациями, специфичными для конкретной популяции [1]. К таким популяциям относится население якутской этнической группы Республики Саха (Якутия) [2]. Актуальность ДНК-диагностики наследственных заболеваний обусловлена как их широкой распространенностью, так и тяжестью последствий при несвоевременном выявлении. Важной областью ДНК-диагностики является массовый скрининг гетерозиготного носительства мутаций, который может осуществляться на различных уровнях онтогенеза — у взрослого организма, у новорожденного, пренатально и преимплантационно [3]. С целью создания эффективного инструмента для проведения массового молекулярно-генетического скрининга был разработан и апробирован ДНК-биочип для быстрого диагностического тестирования пяти наиболее распространенных наследственных заболеваний в Якутии: 3-М-синдром, SOPH-синдром, наследственная энзимопенческая метгемоглобинемия 1А типа, тирозинемия 1А типа, наследственная несиндромальная глухота 1А типа. Были уточнены частоты гетерозиготного носительства данных заболеваний среди здорового населения с использованием ДНК-биочипа. Тест-система послужит платформой для решения широкого круга практических диагностических задач: как этап в схеме пренатального скрининга, при планировании семьи в группах риска, при неонатальной диагностике. По данному способу диагностики получен патент РФ «Способ одновременной диагностики наследственных заболеваний» № 2627115 от 03.08.2017 г.

Литература

1. Гинтер Е. К. Этнические особенности распространения наследственных болезней // Генетика человека. М., 1978. Т. 3. С. 122–159.

2. Пузырев В. П., Максимова Н. Р. Наследственные болезни у якутов // Генетика. 2008. № 44. С. 1308–1314.

3. Wilson R. D. et al. Joint SOGC–CCMG opinion for reproductive genetic carrier screening: an update for all Canadian providers of maternity and reproductive healthcare in the era of direct-to-consumer testing //Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. 2016. Vol. 38. № 8. P. 742–762. e3.

© М. Т. Саввина, Н. Р. Максимова, А. Л. Сухомясова, А. Л. Данилова, 2021

* Работа была выполнена при поддержке гранта «Федеральная целевая программа “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”» № 14.575.21.0015 и в рамках госзадания Минобрнауки РФ (проект FSRG-2020-0014: «Геномика Арктики: эпидемиология, наследственность и патология»).

РЕАЛИЗАЦИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕДКИХ ГЕНОВАРИАНТОВ SARS-COV-2 НА ВСЕРОССИЙСКОЙ ПЛАТФОРМЕ VGARUS

С. О. Синицын [1,2], И. К. Чудинов [1,2], А. С. Сперанская [1], А. Е. Самойлов [1], И. А. Котов [1], К. Ф. Хафизов [1], Н. А. Кинаш [1], Е. А. Евстифеев [1], В. В. Быковский [1], А. А. Остроушко [1], В. Г. Акимкин [1]

[1] *Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва*
[2] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

E-mail: sinitsyn.so@phystech.edu

Аннотация

Для идентификации геновариантов SARS-CoV-2 по данным полногеномного, а также фрагментного секвенирования нами было разработано специализированное ПО PARuS, которое в настоящее время имплементировано в портал VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). В данной работе мы описываем принципы работы алгоритма PARuS.

Введение

В декабре 2019 года Всемирная организация здравоохранения была проинформирована об обнаружении случаев пневмонии, вызванной неизвестным возбудителем, затем китайские службы сообщили ВОЗ об учащении случаев пневмонии в городе Ухань провинции Хубэй. Патоген оказался новым коронавирусом (ныне известным как SARS-CoV-2, ранее — под временным названием 2019-nCoV), который ранее не обнаруживался среди человеческой популяции. 11 марта 2020 года эпидемия была признана пандемией. С момента обнаружения первого уханьского образца SARS-CoV-2 постепенно начали появляться новые геноварианты, на данный момент классифицируемые ВОЗ на три основные группы: «варианты, вызывающие беспокойство (VOC)» (Alpha, Beta, Gamma, Delta), «варианты, вызывающие интерес (VOI)» (Eta, Iota, Kappa, Lambda), а также группа вариантов, потенциально опасных для человека. Очевидно, что необходимо своевременно их идентифицировать с целью контроля их распространения.

Результаты

Для решения указанных задач весной 2021 года была создана всероссийская платформа по агрегации данных о геномах SARS-CoV-2 — VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). В сборе данных участвуют 14 институтов Роспотребнадзора. С весны 2021 года в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации № 448, утвержденным 23 марта 2021 г., к работе портала стали подключаться иные исследовательские институты РФ.

В настоящее время на портал VGARus поступают данные в двух вариантах: полногеномные сиквенсы и сиквенсы фрагмента генома, а именно S-гена SARS-CoV-2. Такая стандартизация типов данных позволяет обеспечить унифицированный сбор информации, практически не зависящий от материально-технической базы подведомственных институтов.

Существуют различные методы определения геновариантa по нуклеотидной последовательности, одним из которых является построение филогенетических деревьев. Данный подход используется в таких популярных сервисах, как PANGOLIN и Nextclade, но их область применения ограничена — для корректного анализа подходят только полные геномы. В связи с этим для анализа всех данных, приходящих от различных институтов, было разработано специализированное ПО PARuS (Polymorphism Analysis of Russian SARS-Cov-2). Принцип работы PARuS заключается в сопоставлении мутаций, найденных в исследуемом образце, с характерными мутациями в S-гене для каждого рассматриваемого геновариантa. Основным преимуществом PARuS, по сравнению с PANGOLIN и Nextclade, является возможность идентифицировать геновариант как для полных, так и фрагментных последовательностей SARS-Cov-2.

Заключение

Таким образом, в настоящее время на платформе VGARus в режиме реального времени, по мере загрузки новых данных секвенирования, осуществляется анализ всех данных: для полногеномных последовательностей — параллельная обработка PANGOLIN и PARuS, для фрагментных обработка — при помощи PARuS.

© С. О. Синицын, И. К. Чудинов, А. С. Сперанская, А. Е. Самойлов, И. А. Котов, К. Ф. Хафизов, Н. А. Кинаш, Е. А. Евстифеев, В. В. Быковский, А. А. Остроушко, В. Г. Акимкин, 2021

МЕТОД БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ КАЧЕСТВА КОЗЬЕГО МОЛОКА ПРИ ЕГО ПАСТЕРИЗАЦИИ

К. Ю. Сиротина, Ю. В. Щербакова, Ф. Ю. Ахмадуллина

Казанский национальный исследовательский технологический университет

E-mail: karsina808@gmail.com

Аннотация

Изучена антиоксидантная активность козьего молока при различных режимах пастеризации. Методом исследования являлось биотестирование с использованием в качестве тест-объектов инфузорий *Paramecium caudatum*. Основным параметром, который мы определяли в работе, является стрессоустойчивость инфузорий под воздействием стрессора, в качестве которого у нас выступал пероксид водорода. Были выявлены режимы термообработки, обеспечивающие наибольшую сохранность антиоксидантной активности козьего молока.

В последние годы отмечается тенденция к увеличению числа и мощности хозяйств, занимающихся разведением коз. Это связано не только с экономическим эффектом, но и с новой оценкой пищевой ценности козьего молока, обладающего уникальными метаболическими и физиологическими характеристиками. Кроме того, козье молоко обладает мощной антиоксидантной системой, обусловливающей его лечебно-профилактические свойства.

Так как молоко является скоропортящимся продуктом, в молочной промышленности обязательной технологической операцией в производстве всех молочных и молокосодержащих продуктов является тепловая обработка — в основном это пастеризация и стерилизация. Однако тепловая обработка молока приводит к изменениям его компонентов и, соответственно, биологической ценности и антиоксидантной активности.

Поэтому необходим адекватный, доступный для массового применения и экспрессный метод тестирования молока и молочных продуктов, информативный при определении пригодности молока для получения кисломолочной продукции лечебно-профилактического назначения. Наиболее приемлемым в настоящее время признано использование для этих целей тестовых биосистем, отличающихся высокой чувствительностью, низкой стоимостью проведения работ и, самое главное, дающих интегральную оценку исследуемого объекта.

В связи с этим целью настоящей работы является изучение изменения качества козьего молока при пастеризации методом биотестирования.

Предметом исследования являлось качество козьего молока при различных режимах термообработки (65 °С / 30 минут; 76 °С / 5 минут; 90 °С / 20 секунд; 95 °С / 5 минут) и его влияние на стрессоустойчивость равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum*. В работе инфузории культивировали в течение 3 суток на среде Лозин-Лозинского с добавлением проб козьего молока, обработанных при различных режимах пастеризации. На 3-и сутки проводили определение стрессоустойчивости тест-объекта. В качестве основного параметра исследования в работе фиксировали время обездвиживания парамеций под воздействием стрессора — 1,5 % пероксида водорода.

Согласно нашим исследованиям: 1) установлена высокая чувствительность выбранного тест-объекта к изменению антиоксидантных свойств козьего молока, обработанного при различных режимах пастеризации; 2) было показано увеличение стрессоустойчивости инфузорий *Paramecium caudatum* при добавлении к питательной смеси нативного козьего молока по сравнению с контролем; 3) выявлены режимы термообработки, обеспечивающие наибольшую сохранность антиоксидантной активности козьего молока и, соответственно, более высокую стрессоустойчивость инфузорий *Paramecium caudatum*: 76 °С / 5 минут и 90 °С / 20 секунд.

© К. Ю. Сиротина, Ю. В. Щербакова, Ф. Ю. Ахмадуллина, 2021

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И СТАНДАРТИЗАЦИИ НАНОРАЗМЕРНОЙ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА АДРЕСНОГО ДЕЙСТВИЯ

М. Б. Сокол [1], Н. Г. Яббаров [1], М. Р. Моллаева [1], М. В. Чиркина [1], В. Ю. Балабаньян [2], Е. Д. Никольская [1]

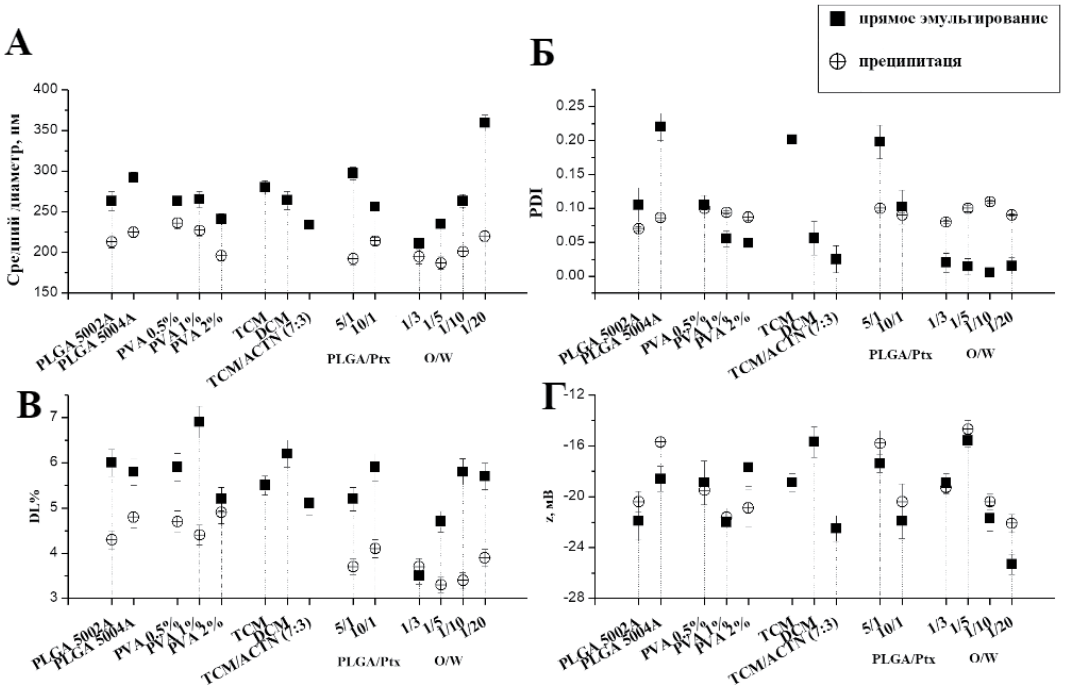
[1] *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E-mail: mariyabsokol@gmail.com

Аннотация

Серьезные побочные эффекты противоопухолевого вещества паклитаксел (Ptx) связаны с использованием в формуляции солюбилизатора Chromophore EL и неспецифичностью действия препарата, что ограничивает его использование в клинике. В работе описаны подходы к получению и стандартизации наночастиц паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), конъюгированных с векторной молекулой рекомбинантного третьего домена альфа-фетопротеина (rAFP3d). Полученная наноразмерная адресная форма Ptx обладала улучшенным профилем безопасности за счет увеличения тропности наночастиц к опухолевым клеткам-мишеням и увеличением биодоступности Ptx.

С целью оптимизации процесса получения наночастиц оценивали влияние различных технологических параметров на размер, индекс полидисперсности (PDI), дзета-потенциал (z) и общее содержание (DL) Ptx в частицах (см. рисунок). Частицы получали с помощью стандартных методов инкапсулирования гидрофобных веществ — нанопреципитации и прямого эмульгирования, варьируя тип полимера (PLGA5002A и PLGA5004A), концентрацию стабилизатора эмульсии (поливиниловый спирт; 0,5, 1 и 2 %), растворитель (хлороформ, хлористый метилен, смесь «хлороформ : ацетон» в соотношении 7 : 3) и соотношение объема органической фазы к водной (O/W; 1/3, 1/5, 1/10 и 1/20).



Подбор условий процесса получения наночастиц с Ptx методами прямого эмульгирования и преципитации (n = 3). Зависимости А) среднего диаметра, Б) PDI, В) DL и Г) z от условий получения

Было установлено, что параметры PLGA5002A, 1 % PVA, хлористый метилен и соотношение O/W 1/10 позволили получить наночастицы с наименьшим средним диаметром (263 ± 8 нм) и максимальной эффективностью инкапсуляции (DL 6 масс. %); z частиц составил –21,7 ± 1,4 мВ, что указывает на их агрегационную устойчивость.

© М. Б. Сокол, Н. Г. Яббаров, М. Р. Моллаева, М. В. Чиркина, В. Ю. Балабаньян, Е. Д. Никольская, 2021

С целью оптимизации процесса конъюгации частиц с векторной молекулой варьировали количество вносимых в реакционную массу активаторов карбоксильных групп EDC и NHS, а также rAFP3d, исходя из концентрации карбоксильных групп 6 мг KOH/г, указанной в спецификации. Было установлено, что 5-кратный мольный избыток EDC и NHS, а также соотношение PLGA-COOH/rAFP3d 5 : 1 обеспечивали высокую эффективность конъюгации при минимальных начальных загрузках. Полученный конъюгат обладал средним диаметром 280 ± 12, DL 5,1% и *z* –27 ± 5 мВ.

На основе требований общей фармакопейная статья ОФС.1.4.1.0007.15 ГФ XIV «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС.1.7.1.0011.18 ГФ XIV «Биотехнологические лекарственные препараты» был разработан перечень основных показателей для стандартизации полученной наноразмерной формы паклитаксела (см. таблицу).

Спецификация качества наноразмерной формы паклитаксела

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный ГФ XIV; ОФС.1.1.0001.15	Лиофилизированный порошок или пористая масса белого или белого с серым оттенком цвета. После растворения: полупрозрачная однородная суспензия белого или белого с серым оттенком цвета
Подлинность	ВЭЖХ ГФ XIV; ОФС.1.2.1.2.0005.15	Время удерживания стандартного образца Ptx должно соответствовать времени удерживания испытуемого образца
Размер частиц	Метод динамического светорассеяния	Не менее 250 и не более 300 нм
pH суспензии	Потенциометрический ГФ XIV; ОФС.1.2.1.0004.15	5,8–7,6
Ресуспендируемость	Визуальный ГФ XIV, ОФС.1.4.1.0010.15	Не более 15 мин в среде 0,9 % хлорида натрия
Время седиментационной устойчивости	Визуальный ГФ XIV; ОФС.1.4.1.0014.15	Не менее 4 ч
Содержание воды	Метод К. Фишера (полумикрометод) ГФ XIV; ОФС.1.2.3.0002.15	Не более 3 %
Механические включения		
Видимые частицы	Визуальный ГФ XIV; ОФС.1.1.0001.15	Видимые частицы должны отсутствовать
Невидимые частицы	Микроскопия ГФ XIV; ОФС.1.4.2.0006.15	Частиц ≥ 10 мкм: не более 3000/фл. Частиц ≥ 25 мкм: более 300/фл.
Количественное определение Ptx	ВЭЖХ ГФ XIV; ОФС.1.2.1.2.0005.15	90–110 % от номинального значения
Количественное определение rAFP3d	Колориметрический (с бицинхониновой кислотой) ГФ XIV; ОФС.1.2.3.0012.15	90–110 % от номинального значения
Родственные примеси	ВЭЖХ ГФ XIV; ОФС.1.2.1.2.0005.15	Суммарное количество примесей не более 3,7 %
Остаточные органические растворители	Газовая хроматография ГФ XIV; ОФС.1.1.0008.15; ОФС.1.2.1.2.0004.15	Хлористый метилен не более 0,06 %
Тяжелые металлы	Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой ГФ XIV; ОФС.1.2.2.2.0012.15	Не более 100 ppm
Однородность массы	Гравиметрия ГФ XIV; ОФС.1.4.2.0009.15	1000 ± 25 мг
Остаточная ДНК штамма-продуцента	Молекулярная гибридизация МУК 4.1/4.2.588-96	Не более 10 пг/мг

Показатель	Метод	Норма
Бактериальные эндотоксины	ЛАЛ тест ГФ XIV, ОФС.1.2.4. 0006.15	Не более 0,25 ЕЭ/мг
Стерильность	Мембранная фильтрация ГФ XIV, ОФС.1.2.4. 0003.15	Должен быть стерильным

Выводы

Разработан метод получения наноразмерной формы Ptx в составе наночастиц PLGA, конъюгированных с белковой векторной молекулой. Изложены основные показатели, которые могут быть использованы для стандартизации лекарственного средства адресного действия в виде лиофилизата полимерных наночастиц с векторной белковой молекулой.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *DAEDALEOPSIS CONFRAGOSA* НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ *IN VITRO* И КСЕНОГРАФТЫ U87MG У МЫШЕЙ SCID

О. И. Соловьёва [1], Е. Л. Завьялов [1], Т. В. Теплякова [2], И. А. Разумов [1, 2]

[1] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

E-mail: solovieva@bionet.nsc.ru

Аннотация

Варианты экстракта гриба *Daedaleopsis confragosa* F-1368, отличающиеся по концентрации белков и полисахаридов, были протестированы на 6 линиях опухолевых клеток человека с применением МТТ и клоногенного тестов *in vitro* и на ксенографтах у мышей SCID. По результатам было установлено, что экстракт F-1368 снижает жизнеспособность и пролиферативную активность опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

В настоящее время существуют данные о противоопухолевом действии грибных полисахаридов. Имеются ссылки на противоопухолевое действие *D. confragosa*, штамм F-1368 (далее — F-1368), что, на наш взгляд, делает его перспективным объектом для изучения. Цель работы — определить наличие противоопухолевого действия F-1368 на раковые клетки человека различного тканевого происхождения. В работе использовали 3 варианта экстракта F-1368, полученные из коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (см. таблицу), и линии клеток: ФЭЧ-15 фибробласты эмбриона человека, U87MG глиобластома, HepG2 гепатоцеллюлярная карцинома, C33A карцинома матки, SK-Mel28 меланома, MDA-MB-231 карцинома молочной железы, SW620 карцинома кишечника. Клетки получали из криобанка ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН. Для оценки противоопухолевой активности *in vitro* проводили МТТ-тест и клоногенный тест по стандартным методикам. Для исследования *in vivo* использовали мышей линии SCID с гетеротопическими ксенографтами клеток U87, которые моделировали и измеряли по ранее описанной методике [1]. Животным подкожно вводили препарат К3 по 3 раза в неделю в течение месяца.

Препараты F-1368 были протестированы *in vitro* на клетках ФЭЧ-15 и в исследованных дозах не оказали токсического действия на нетрансформированные клетки человека. Далее были определены летальные дозы (LD100) препаратов F-1368 для опухолевых клеток. В МТТ-тесте лучшие результаты были получены при воздействии препарата К4 на клетки C33A: 9,2 мкг/мл по белкам и 12,6 мкг/мл по полисахаридам. В клоногенном тесте лучшие результаты получены при воздействии препаратов К4: 1,1 мкг/мл по белкам и 1,6 мкг/мл по полисахаридам и К3: 0,5 мкг/мл по белкам и 3 мкг/мл по полисахаридам на клетки U87GFP.

Код и концентрация (мкг/мл) использованных экстрактов

Код	*Белки*	*Полисахариды*
К2	700	0
К3	500	2900
К4	730	1000

Оба теста показали, что наиболее эффективен *in vitro* препарат К4 (низкое содержание полисахаридов), это позволяет предположить, что определенную роль в противоопухолевой активности F-1368 играют как белки, так и полисахариды. Длительное воздействие F-1368, рассмотренное в клоногенном тесте, нарушает пролиферацию опухолевых клеток. При этом кратковременное воздействие F-1368 в МТТ-тесте тоже оказалось эффективно, что указывает, по-видимому, на снижение функций митохондрий в опухолевых клетках.

Опираясь на результаты клоногенного теста, мы исследовали влияние К3 на рост подкожных ксенографтов U87 мышей SCID. Через 3 недели после начала инъекций К3 ксенографты животных экспериментальной группы были в 2 раза меньше контрольных ($p < 0,05$, M-W U-test).

Таким образом, было выявлено, что экстракт F-1368 оказывает противоопухолевое действие на злокачественные клетки человека как *in vitro*, так и *in vivo*, при этом повышенная концентрация полисахаридов в экстракте, возможно, не играет ведущей роли.

Литература

1. Соловьёва О. И., Завьялов Е. Л., Теплякова Т. В. и др. Эффект экстракта мицел*ия Duddingtonia flagr*ans на подкожные ксенографты клеток С33а карциномы шейки матки человека // Сибирский онкологический журнал. 2020. № 6. С. 93–98.

© О. И. Соловьёва, Е. Л. Завьялов, Т. В. Теплякова, И. А. Разумов, 2021

НАНОАНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ SARS-COV-2

П. П. Солодков

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет

E-mail: p.solodkov@g.nsu.ru

Аннотация

Пандемия COVID-19, обусловленная коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2), и ее глобальные социальные и экономические разрушительные последствия ознаменовали третье зоонозное внедрение высокопатогенного коронавируса в человеческую популяцию. У пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, развиваются респираторные симптомы различной степени тяжести, способные привести к летальному исходу. По данным ВОЗ, мировая статистика заболеваемости и смертности по COVID-19 продолжает пополняться новыми случаями, несмотря на наличие вакцин. Также появляются новые мутантные штаммы вируса, поэтому необходимость разработки и применения эффективных средств диагностики и терапии заболевания все еще существует.

SARS-CoV-2 проникает в клетки человека с помощью рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка на поверхности вируса, RBD способен взаимодействовать с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), который преимущественно экспрессируется на мембранах пневмоцитов 2-го типа и кишечных эпителиальных клеток. Таким образом, взаимодействие RBD-ACE2 отражает четкую терапевтическую мишень для нейтрализации вируса и предотвращения инфекции, а нейтрализующие антитела являются эффективными специфичными противовирусными агентами, способными напрямую нейтрализовать вход вируса в клетку хозяина.

Данная работа направлена на получение и анализ однодоменных VHH-антител (наноантител) ламы, нейтрализующих RBD-ACE2 взаимодействие. Наноантитела были выбраны в качестве целевого противовирусного агента из-за ряда своих преимуществ. Они обладают малым размером, который позволяет им связывать недоступные для обычных IgG эпитопы, высокой стабильностью и растворимостью, нередко обладают более высокой аффинностью к антигенам благодаря удлиненной петле CDR3, могут быть эффективно произведены при низких затратах в микроорганизмах, а также на основе наноантител можно сконструировать различные мультимерные молекулы для придания авидности.

На текущий момент после серии иммунизаций ламы с рекомбинантным RBD были выделены периферические B-лимфоциты и сконструирована кДНК-библиотека VHH-последовательностей представительностью 10^8 клонов. Скрининг библиотеки проводился с помощью аффинной селекции. По результатам иммуноферментного анализа и секвенирования было обнаружено 32 независимых клона, продукты экспрессии которых связывают RBD. Из них 3 наноантитела высокоаффинны ($K_D \sim 10^{-9}$–10^{-12}) и блокируют взаимодействие RBD-ACE2 с IC_{50} ~ 30–100 нг/мл (2–6 нМ) при конкурентном ИФА и в псевдовирусной системе. Дальнейший анализ показал, что данные наноантитела распознают как минимум два различных эпитопа RBD.

Последовательности, кодирующие высокоаффинные и нейтрализующие наноантитела, были далее клонированы в вектор для наработки VHH с Fc-фрагментом IgG человека. Данные VHH-Fc были использованы для оценки защитных свойств против SARS-CoV-2 на сирийских хомяках и обеспечили профилактический и терапевтический эффект в дозе 10 мг/кг веса при дозе инфекции 10^4 PFU.

Дальнейший анализ нейтрализующих свойств наноантител был проведен с использованием трех мутантных штаммов SARS-CoV-2. В результате оказалось, что все три наноантитела успешно нейтрализуют штамм «дельта» (IC_{50} ~ 15–170 нг/мл), два наноантитела нейтрализуют штамм «каппа» (IC_{50} ~ 33–39 нг/мл) и только одно наноантитело способно нейтрализовать штамм «лямбда» (IC_{50} ~ 58 нг/мл).

В ходе проведения дальнейшей работы планируется получить мультиспецифичные мультимерные конструкции на основе полученных наноантител, оценить их аффинность, авидность и нейтрализующие свойства; провести эпитопное картирование, а также тесты на аутореактивность и иммуногенность.

* © П. П. Солодков, 2021

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ИСКУССТВЕННЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА *

Е. В. Старостина, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, Д. В. Антонец, В. Ю. Марченко, С. И. Бажан

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

E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru

Аннотация

Работа посвящена исследованию искусственных вакцинных конструкций, спроектированных с использованием консервативных последовательностей белков вируса гриппа для индукции перекрестного Т- и В-клеточного иммунитета против вируса гриппа А на примере двух сезонных штаммов A/Aichi/2/68(H3N2) и A/California/4/2009(H1N1pdm09).

Ежегодные сезонные вспышки гриппа во всем мире поражают 5–15 % населения и вызывают значительную смертность среди групп риска, а также наносят большой экономический ущерб. Традиционные профилактические вакцины против гриппа изготавливают из эпидемически значимых аттенуированных живых или инактивированных штаммов вирусов, но высокая вариабельность вирусов гриппа позволяет им избегать ранее существовавший иммунитет, и следовательно, чтобы соответствовать фактическим циркулирующим штаммам, состав вакцины против гриппа приходится менять каждые два или три года. В связи с этим разработка универсальной противогриппозной вакцины, способной вызывать защитный иммунитет против максимально широкого круга штаммов вируса гриппа, является чрезвычайно актуальной задачей.

Для создания Т-клеточных ДНК-вакцинных конструкций p-Ub-muTAg и p-LP-muTAg-LAMP использовался подход, основанный на компьютерном дизайне искусственных полиэпитопных белков-антигенов, в состав которых вошли консервативные Т-клеточные эпитопы (как CTL, так и Th), локализованные в последовательностях всех основных белков вируса гриппа (PA, PB1, PB2, HA, NA, M1, NP, NS1 и NS2). С использованием двух методов была подтверждена экспрессия целевых генов в составе ДНК-вакцинных конструкций на уровне мРНК и белка. Далее исследовали перекрестную защиту (cross protection) против двух штаммов вируса гриппа, A/California/4/2009(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2), относящимися к двум разным подтипам, у мышей BALB/c, иммунизированных смесью ДНК-вакцинных конструкций p-Ub-muTAg и p-LP-muTAg-LAMP. Полученные результаты свидетельствует о том, что комбинация двух искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов в составе ДНК-вакцины способна индуцировать у мышей перекрестный протективный иммунитет в отличие от иммунизации живыми вакцинными штаммами.

Для индукции кросс-протективных антител и цитотоксических Т-лимфоцитов были сконструированы ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие консервативные фрагменты стебля гемагглютинина двух подтипов (AgH1, AgH3) и консервативный белок M2 (AgM2) вируса гриппа А. Результаты исследования специфической активности спроектированных ДНК-вакцинных конструкций показали, что каждая из них обеспечивает экспрессию целевых генов в клетках HEK293T, а их комбинация при иммунизации мышей линии BALB/c индуцирует ответы специфических антител и CTL, которые обеспечивают защиту животных от заражения двумя исследуемыми штаммами. При этом антитела взаимодействовали как с H1N1, так и H3N2 вирусными антигенами в ИФА, а ответы CTL в группе мышей, иммунизированных смесью целевых ДНК-вакцинных конструкций, достоверно превышали ответы в группах животных, иммунизированных вакцинными штаммами A/California/07/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2).

Таким образом, полученные результаты показали, что сконструированные генно-инженерные конструкции обеспечивают перекрестную защиту животных от летального заражения двумя сезонными штаммами вируса гриппа А. Результаты демонстрируют потенциальный подход к созданию универсальной вакцины против гриппа на основе искусственных антигенов.

© Е. В. Старостина, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, Д. В. Антонец, В. Ю. Марченко, С. И. Бажан, 2021

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

БИОАКАРИЦИДЫ — РЕГУЛЯТОРЫ ЧИСЛЕННОСТИ ПЕРЕНОСЧИКОВ ТРАНСМИССИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

К. А. Столбунова, О. В. Охлопкова, Т. В. Теплякова

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

E-mail: kristina.sunwo@gmail.com

Аннотация

Изучены акарицидные свойства трех штаммов энтомопатогенных грибов из коллекции лаборатории микологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и получены результаты положительной динамики гибели иксодовых клещей под воздействием различных штаммов.

Трансмиссивные заболевания представляют собой болезни, возбудители которых (вирусы, бактерии, простейшие и гельминты) передаются человеку посредством укуса кровососущих насекомых и членистоногих. Достаточно серьезный урон для здоровья и жизни человека могут наносить такие переносчики, как иксодовые клещи, поскольку они способны передавать человеку ряд опасных заболеваний: вирусный клещевой энцефалит, туляремию, болезнь Лайма, геморрагическую лихорадку, моноцитарный эрлихиоз человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека и другие.

В настоящее время классическое интенсивное использование химических пестицидов в различных областях деятельности человека вступило в противоречие с глобальной проблемой защиты окружающей среды. Ядохимикаты оказывают негативное влияние не только на окружающую среду, но и на здоровье человека, как результат прямого действия и путем накопления в питьевой воде или сельскохозяйственных культурах, которые впоследствии могут попадать в организм человека, вызывая отравления различной степени тяжести. Поэтому использование пестицидов в борьбе с насекомыми и членистоногими нежелательно. Это вызывает потребность в поиске альтернативного, экологически приемлемого способа защиты от кровососущих вредителей. Наиболее подходящее решение данной проблемы — биопестициды, в состав которых входят природные микроорганизмы. В частности, в данной работе рассмотрены микромицеты из родов Beauveria, Cordyceps, способные регулировать численность переносчиков трансмиссивных заболеваний.

Цель исследования — оценка акарицидной активности штаммов микромицетов в суспензиях двух видов и выявление наиболее эффективного варианта.

Материалы и методы

В ходе работы были использованы два штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana sp.*, один штамм *Cordyceps sinensis sp.* и иксодовые клещи родов Dermacentor и Ixodes в стадии жизненного цикла имаго, собранные на флаги. Приготовление споровых суспензий осуществлялось на дистиллированной воде с добавлением Твин-80. Полученные суспензии (с концентрацией 1,3×106 — 2,1×107 спор/мл) составляли 2 варианта: 1 — использовали сразу после приготовления; 2 — использовали спустя 1 сутки после приготовления. Титр определяли с помощью камеры Горяева. Заражение членистоногих проводилось путем купания в течение нескольких секунд в споровой суспензии. После заражения клещи были помещены с пластиковые чашки Петри со смоченной фильтровальной бумагой и заклеены лентой парафилма. Наблюдение за клещами происходило в течение месяца с использованием микроскопа.

Результаты и обсуждение

В ходе проведения исследования первые погибшие клещи начали появляться на 6-е сутки при заражении грибом *Beauveria bassiana sp.* На 8-е сутки начал себя проявлять штамм *Beauveria bassiana* 80-04. На 12-е сутки появились результаты для Cordyceps *sinensis sp.* Наилучший результат показала грибная суспензия штамма Cordyceps *sinensis sp.*, полученная за 1 сутки до эксперимента. В этом варианте на 20-е сутки была установлена 100 % гибель клещей. Возможно, произошла экстракция в воду биологически активных веществ (БАВ) из спор гриба, которые проявили повышенную акарицидную эффективность (рис. 1, 2).

© К. А. Столбунова, О. В. Охлопкова, Т. В Теплякова, 2021

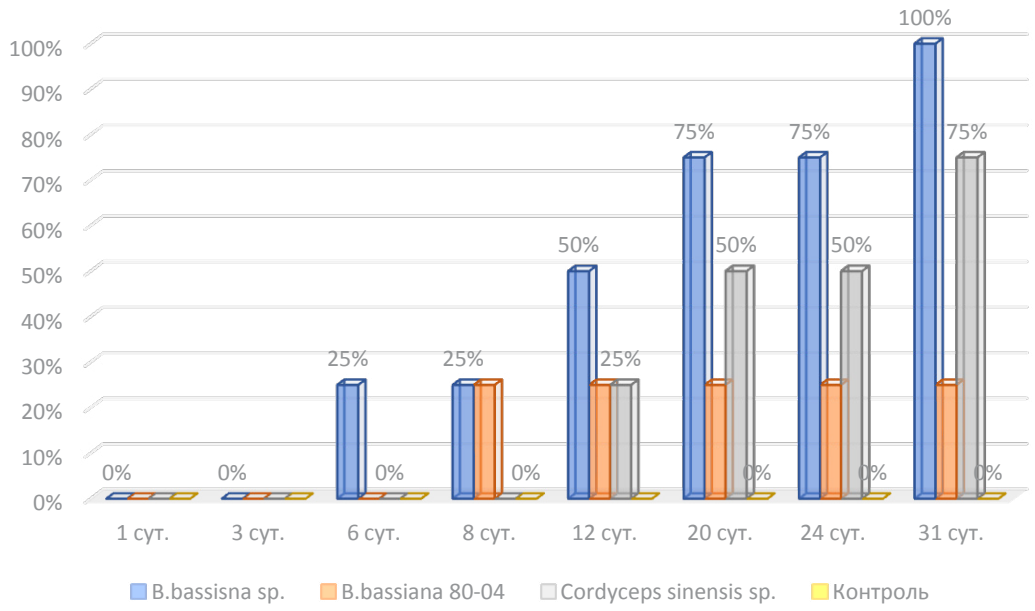


Рис. 1. Динамика смертности иксодовых клещей с использованием свежеприготовленной суспензии

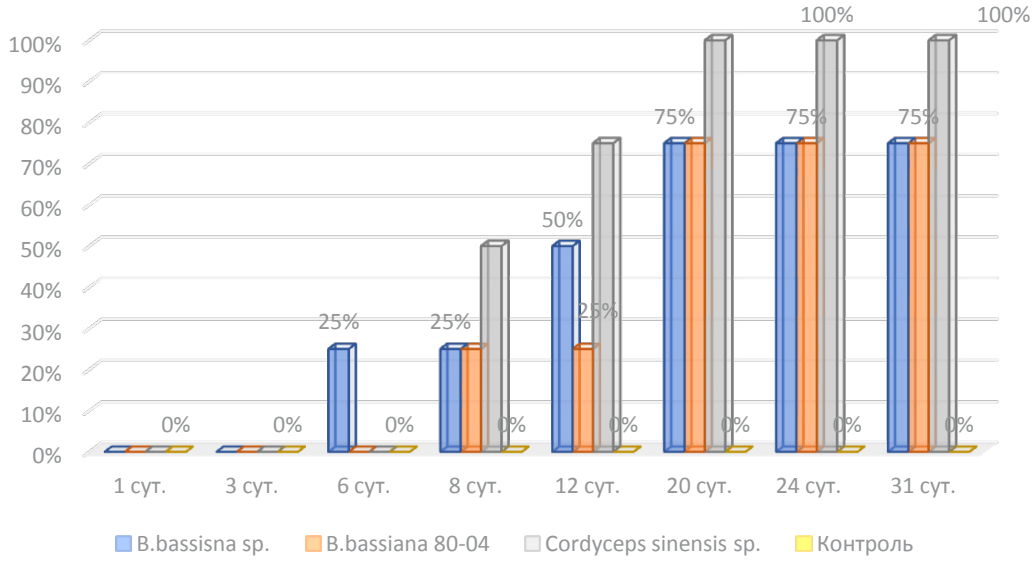


Рис. 2. Динамика смертности иксодовых клещей с использованием водной суспензии, приготовленной за 1 сутки до применения

САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ РНК (SARNA), КОДИРУЮЩИЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ

А. А. Сульгин, И. Р. Иматдинов

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

E-mail: sulgin_aa@vector.nsc.ru

Аннотация

В ходе работы получены синтетические конструкции, кодирующие гены иммунодоминантных белков вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), которые необходимы для разработки и прототипирования кандидатных самореплицирующихся РНК-вакцин против ККГЛ.

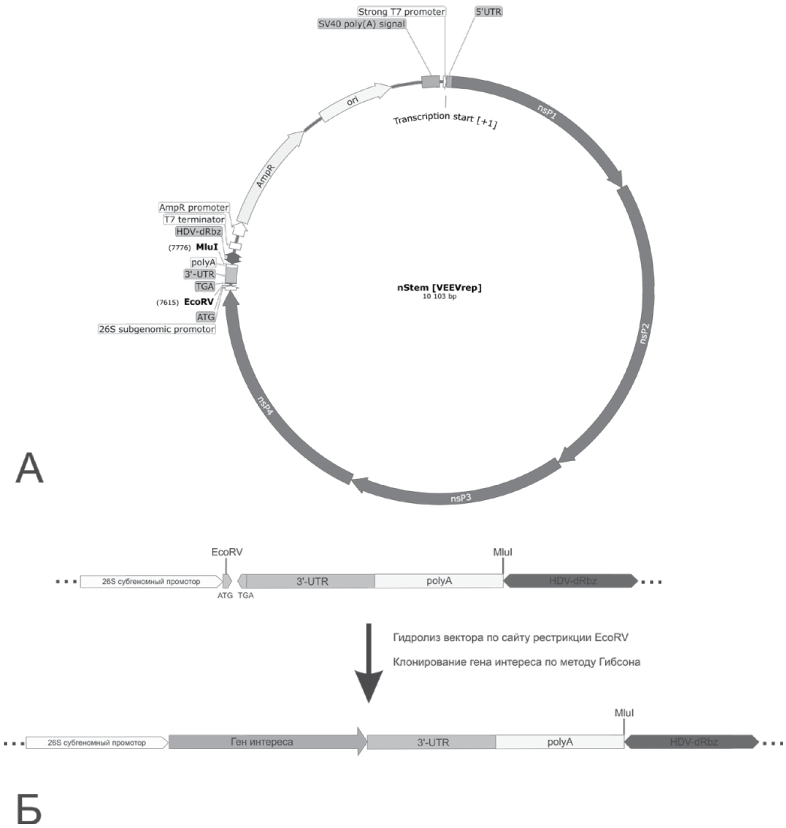
Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ) — это особо опасная природно-очаговая вирусная инфекция, характеризующаяся высокой летальностью (от 5 до 40 %) и широкой распространенностью (юг Европейской части Российской Федерации, а также более 30 стран Европы, Азии и Африки). Создание эффективных препаратов против ККГЛ осложняется высокими требованиями к биобезопасности при культивировании инфекционного агента (BSL-3), недостаточной изученностью возбудителя и необходимостью применения новых подходов при конструировании профилактических препаратов, так как классические подходы вакцинологии оказались неэффективными.

Одной из перспективных платформ для разработки вакцин нового поколения против эмерджентных и особо опасных вирусных инфекций являются самореплицирующиеся РНК на основе репликонов альфавирусов. При проникновении в клетку с альфавирусных репликонов транслируются белки репликационного комплекса (nsP1-nsP4), которые обеспечивают усиленную транскрипцию субгеномных РНК (26S SG RNA), кодирующих целевые антигены.

Целью работы явилось получение конструкций на основе вакцинного штамма ТС-83 вируса венесуэльского энцефалита лошадей (ВЭЛ), обеспечивающих экспрессию генов иммунодоминантных белков вируса ККГЛ (NP, GPC).

В результате работы получена акцепторная конструкция nStem_VEEVrep (см. рисунок, *А*), которая кодирует ген неструктурных белков (nsP1-nsP4), субгеномный вирусный 26S промотор, нативный 5’-UTR и модифицированный 3’-UTR с поли-А последовательностью. Полученная конструкция nStem_VEEVrep необходима для синтеза альфавирусных репликонов (saRNA) посредством *in vitro* транскрипции.

В зависимости от итоговой конструкции в акцепторный вектор клонировали ген флуоресцентного белка dsRedExpress (контроль; nStem_VEEVrep-dsRedExpress), ген NP (открытая рамка считывания S-сегмента; nStem_VEEVrep-CCHFV_NP) или GPC (открытая рамка считывания M-сегмента; nStem_VEEVrep-CCHFV_GPC) вируса ККГЛ, согласно схеме (см. рисунок, *Б*). Корректность



Физическая карта конструкции nStem_VEEVrep (*А*) и схема клонирования гена интереса в полученный акцепторный вектор (*Б*)

© А. А. Сульгин, И. Р. Иматдинов, 2021

нуклеотидных последовательностей конструкций подтверждали методами рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру.

Функциональный анализ проводили путем котрансфекции монослоя клеток линии BHK-21/13 генетической конструкцией nStem_VEEVrep-dsRedExpress и плазмидой pCAG-T7pol, экспрессирующей Т7 РНК-полимеразу (получена ранее в лаборатории). Через 24 часа после котрансфекции наблюдали специфическую флуоресценцию ~ 80 % клеток в поле зрения, что указывает на эффективную транскрипцию и трансляцию с субгеномной РНК.

Полученные конструкции nStem_VEEVrep-CCHFV_NP и nStem_VEEVrep-CCHFV_GPC использованы для постановки *in vitro* транскрипции с целью синтеза самореплицирующихся РНК, кодирующих целевые антигены вируса ККГЛ. Для оценки иммуногенности и безопасности прототипных препаратов будет проведена иммунизация лабораторных животных синтезированными альфавирусными репликонами (saRNA).

СОЗДАНИЕ КОНЦЕПЦИИ ПРОИЗВОДСТВА БИОСЕНСОРА НА ЭФФЕКТЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ 3D-ПЕЧАТИ

Г. М. Токин

Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

E-mail: njrb@mail.ru

Аннотация

В последнее время приоритетом научных исследований в области биосенсорики является быстрое и высокоточное определение биоаналитов и ускоренные темпы производства биосенсорных систем. Благодаря этому диагностика и выявление биологических поражающих агентов и токсичных загрязняющих веществ являются более доступными и менее затратными как для производителя, так и для потребителя. Области применения биосенсоров затрагивают пищевую промышленность, военную промышленность, контроль окружающей среды и медицину. На данный момент разрабатываются различные устройства, выступающие в качестве сенсоров, основанные на химических, электрических и оптических способах получения сигналов. Особый интерес представляют оптические датчики, поскольку они позволяют проводить неразрушающий контроль сразу нескольких параметров в сложных многокомпонентных системах.

В данной работе рассматривается биосенсор на эффекте поверхностно-локализованного плазмонного резонанса. Свойства локализованного резонанса напрямую зависят от размеров и формы металлических наночастиц, нанесенных на поверхность призмы, а значит, эти параметры влияют на эффективность взаимодействия колебаний с молекулами и квантами света. Это позволяет улучшить чувствительность и селективность оптических методов.

В большинстве биосенсоров в качестве чувствительного элемента используются биологические рецепторы, которые генерируются естественной эволюцией в живых организмах. Они демонстрируют удивительную способность специфически распознавать различные антигены. При применении в качестве распознавательного элемента биосенсоров эти рецепторы обеспечивают очень высокую селективность. Однако они страдают от нестабильности в условиях измерения и низкой долговечностью. Разработка искусственных рецепторов может обойти эти недостатки.

В рамках данной работы была разработана методика создания биосенсора на эффекте поверхностного локализованного плазмонного резонанса с использованием передового способа быстрого производства объектов и структур, такого как 3D-печать, которая ускоряет и удешевляет создание детектирующих устройств, и молекулярного импринтированного полимера, который заменит такой нестабильный и недолговечный биологический распознавательный элемент.

Предлагаемая технология подразумевает внедрение наночастиц в полимер при печати призмы на 3D-принтере, чтобы в ней возникал локализованный плазмонный резонанс; нанесение молекулярного импринтированного полимера на призму, включающее такие этапы, как образование предполимеризационного комплекса с полимеризуемыми функциональными мономерами, полимеризацию, и удаление шаблона.

Все это позволит создать принципиально новое, простое в изготовлении и в использовании устройство для детектирования различных молекул.

© Г. М. Токин, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ В СОСТАВЕ ПЛЕНОК ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА НА РОСТ МСК*

Д. Ю. Травникова[1], Е. А. Акулина[1], М. С. Холина[1], Н. В. Белишев[1], И. И. Жаркова[1], Р. А. Сурменев[2], М. А. Сурменева[2], В. В. Воинова[1], А. П. Бонарцев[1]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Томский политехнический университет*

E-mail: darija-travnikova@yandex.ru

Аннотация

В настоящее время магнитным наночастицам уделяется особое внимание в разных областях биомедицины, таких как магнитно-резонансная томография, онкология, в качестве терапевтического компонента в инициировании гибели опухолевых клеток или эффективного носителя для доставки лекарств. В данной работе получены композитные пленки на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) с добавлением разных типов магнетитов, произведена оценка биосовместимости композитных пленок с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК).

Материалы и методы

В работе использовались непористые биополимерные пленки, источником которых являлся ПОБ с добавлением магнетитов различного состава, которые были любезно предоставлены коллегами из Томского политехнического университета. Ключевым компонентом магнетитов являлся Fe_3O_4, в состав некоторых образцов также входил оксид графена и лимонная кислота.

ПОБ был получен с помощью методики контролируемого биосинтеза штаммом-продуцентом *Azotobacter chroococcum*, описанной ранее [1]. Пленки из ПОБ были изготовлены методом осаждения раствора полимера в трихлорметане на поверхности стеклянной чашки Петри. Предварительно в раствор был добавлен один из шести образцов магнетита (М0, М1, М3, М7, М8, М11) в одной из трех концентраций (20, 50, 100 %).

Была использована первичная культура МСК, выделенная из жировой ткани 3-дневных самцов крыс линии *Wistar*. Клетки культивировали на чашках Петри в течении 7 дней при температуре 37 °С и 5 % CO_2.

Оценку биосовместимости МСК и пленок проводили с помощью ХТТ (XTT Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Израиль). ХТТ — метод регистрации активности митохондриальных ферментов посредством их окрашивания солями тетразолия ХТТ [2]. МСК использовались в количестве 2 тыс. кл/лунка. Клетки культивировали в течение 7 дней на пленках в плоском 96-луночном планшете (n = 4). ХТТ-тест проводили на 1, 3, 5 и 7-е сутки: пленки с МСК перемещали в чистые лунки, добавляли 100 мкл ростовой среды, 50 мкл активированного раствора ХТТ и инкубировали 2 часа при 37 °С, далее проводили измерение оптической плотности растворов на спектрофотометре (Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector) при длине волны 450 нм (и 620 нм для неспецифических показаний). Предварительно было получено уравнение калибровочной прямой для перевода экспериментальных значений оптической плотности в фактическое количество клеток в лунке.

Результаты

Получены различные биополимерные пленки на основе ПОБ с добавлением разных образцов магнетита (М0, М1, М3, М7, М8, М11) в нескольких концентрациях (20, 50, 100 %). Тест на биосовместимость выявил, что образцы М1 и М11 при концентрации 100 % оказывают крайне негативное действие на клетки (на 7-й день культивирования все клетки погибали). Остальные образцы обладали хорошей биосовместимостью, однако не проявили стимулирующего эффекта на рост клеток. Наилучшие результаты были выявлены при росте МСК на пленке, с добавлением магнетита М8 в концентрации 50 %.

Литература

1. Bonartsev A. P., Zharkova I. I., Yakovlev S. G., et al. Biosynthesis of poly(3- hydroxybutyrate) copolymers by Azotobacter chroococcum 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2017. Vol. 47. № 2. P. 173–184.

2. Демьянова И. В., Акулина Е. А., Труонг Т. Х. и др. Рост мезенхимальных стволовых клеток на пленках поли-3-оксибутирата, загруженных левофлоксацином и симвастатином // Биологический журнал. 2020. № 4(15). С. 4–9.

© Д. Ю. Травникова, Е. А. Акулина, М. С. Холина, Н. В. Белишев, И. И. Жаркова, Р. А. Сурменев, М. А. Сурменева, В. В. Воинова, А. П. Бонарцев, 2021

* Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 20-64-47008). В работе использовано оборудование ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М. В. Ломоносова.

РАЗРАБОТКА ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ВНЕЛАБОРАТОРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ 4-ГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Н. Д. Ушкаленко, Д. В. Шаньшин

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

E-mail: ushkalenko_nd@vector.nsc.ru

Аннотация

На основе метода дот-иммуноанализа на белковых матрицах с дискретно нанесенными реагентами захвата, с использованием конъюгата реагентов детекции с золями золота и химическим усилением оптического сигнала разрабатывается чувствительный тест для одновременного дифференцированного выявления антител к ВИЧ-1, антител к ВИЧ-2 и антигена p24, пригодный для использования во внелабораторных условиях.

Актуальность

ВОЗ и национальные системы здравоохранения рекомендуют широкий скрининг населения для выявления и лечения ВИЧ-инфицированных, а также для принятия ограничительных мер по распространению ВИЧ-инфекции. Для этого используются тест-системы 4-го поколения, позволяющие выявлять антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, а также антиген p24 ВИЧ1, служащий маркером раннего (серонегативного) периода заболевания. Эти тесты реализованы разными способами: ИФА, иммунохроматография, дот-блот-анализ, различные варианты тест-систем с биосенсорами; все они имеют определенные недостатки. Так, ИФА требует дополнительного оборудования и не дает возможности получить информацию, по какому маркеру ВИЧ получился положительный результат. Существующие иммунохроматографические и дот-блот-системы могут использоваться вне лаборатории и позволяют получать результаты по разным маркерам, но не обеспечивают необходимой чувствительности выявления антигена p24.

Цель

Разработка чувствительного теста для одновременного дифференцированного выявления антител к ВИЧ-1, антител к ВИЧ-2 и антигена p24, пригодного для использования во внелабораторных условиях.

Материалы и методы

В основу теста положен метод дот-иммуноанализа на белковых матрицах с дискретно нанесенными реагентами захвата, с использованием конъюгата реагентов детекции с золями золота и химическим усилением оптического сигнала [1].

Результаты

Тест-система включает белковые матрицы из синтетической бумаги с нанесенными реагентами захвата и аналитическую ванну, заполненную готовыми рабочими растворами. На матрице в виде отдельных точек иммобилизованы реагенты захвата: химерный антиген, содержащий домены gp41 и gp120 ВИЧ-1; химерный антиген, включающий домены gp36 и gp105 ВИЧ-2; моноклональные антитела к антигену p24 ВИЧ-1; а также контроли работоспособности конъюгата и системы проявки: антиген p24 ВИЧ-1 и коллоидное золото. Выявление маркеров, выделенных из образца на матрицах, производится с использованием сложного конъюгата — смеси золей золота (20 нм) с химерными антигенами и стрептавидином. Повышение чувствительности обнаружения антигена p24 достигается обработкой матрицы анти-p24 антителами, меченными биотином, с последующей инкубацией в конъюгате со стрептавидином. При этом для сокращения времени анализа этап обработки матрицы с биотинилированными анти-p24-антителами может быть совмещен с инкубацией матрицы с исследуемым образцом. Такой подход позволяет выявлять антиген P24 в концентрации 10 пг/мл, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к тестам 4-го поколения. Полная укомплектованность тест-набора, простота и возможность выполнения анализа при комнатной температуре позволяют использовать тест во внелабораторных условиях.

Литература

1. Poltavchenko A. G. et al. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents // J. Virol. Meth. 2016. Vol. 236. P. 231–236.

© Н. Д. Ушкаленко, Д. В. Шаньшин, 2021

CALCIUM-PHOSPHATE COATINGS DOPED WITH NITRIC OXIDE FOR ORTHOPEDIC APPLICATIONS*

A. Y. Fedotkin, P. V. Maryin

National Research Tomsk Polytechnic University

E-mail: fedotkin_sasha@mail.ru

Abstract

Calcium-phosphate coatings containing nitric oxide deposited on titanium substrates via reactive radiofrequency magnetron sputtering of hydroxyapatite in N_2-containing atmospheres is studied. It is revealed that the coating formed in the gas mixture $Ar/N_2 = 1/1$ is characterized by the best biological properties.

Introduction

Deposition of hydroxyapatite (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) coatings via radiofrequency magnetron sputtering (RFMS) is widely used to increase biocompatibility and bioactivity of metal implants. We assume that the presence of nitric oxide in the composition of the coating should have a beneficial effect on osteosynthesis. Nitric oxide (NO) has the most important regulatory effect on the circulatory system of the human body [1]. In our previous work [2] physicochemical studies of the HA coatings were studied. It was revealed that reactive RFMS of HA in Ar/N_2 gas mixtures makes it possible to deposit NO-containing HA coatings on metal substrates.

The aim of this work is the study of their biological properties of the NO-containing HA coatings formed on the surface of Ti substrates via reactive RF-magnetron sputtering in the mixture of Ar and N_2 at various volume ratios of gases.

Materials and methods

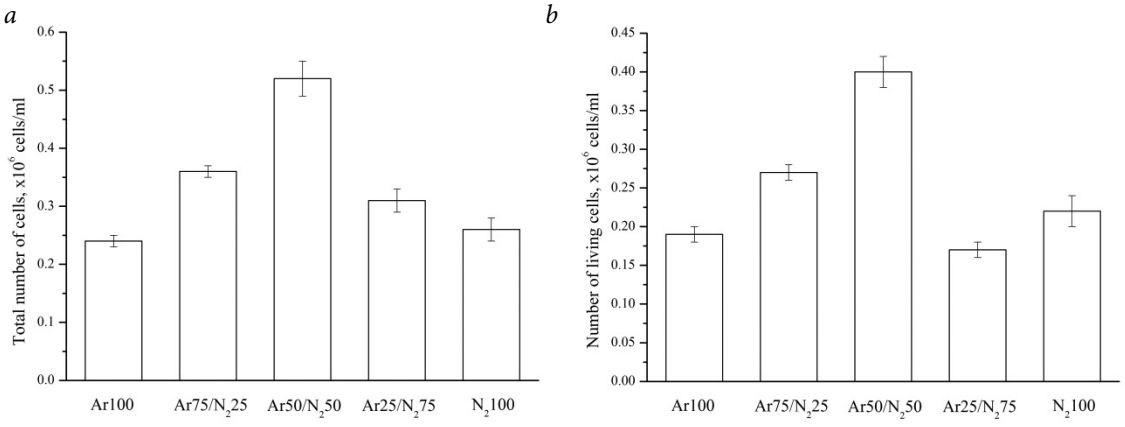
Coatings were deposited on the surface of Ti samples in five Ar/N_2 gas mixtures at different volume ratios: $Ar/N_2 = 100/0$ (Ar100), $Ar/N_2 = 75/25$ ($Ar75/N_225$), $Ar/N_2 = 50/50$ ($Ar50/N_250$), $Ar/N_2 = 25/75$ ($Ar25/N_275$) and $Ar/N_2 = 100/0$ (N_2100). The deposition was carried out with the use of the universal magnetron sputtering system "Cathode-1M" with the following parameters: target-sample distance — 33 mm, chamber pre-pressure — $3 \cdot 10^{-3}$ Pa, chamber working pressure — 0.5 Pa, sputtering time — 3 hours at power density 6.32 W/cm^2.

All the samples were studied by contact profilometry to measure coatings thicknesses. Cellularity and viability were studied by automated cell countering and flow laser cytometry, respectively, under a contract at the Immanuel Kant Baltic Federal University.

Results

No correlation between deposition rate and gases ratios was revealed (figure). For the coating groups Ar100, Ar75/N225, Ar50/N250, Ar25/N275 and N_2100, the deposition rates were 0.167 ± 0.003 μm/h, 0.123 ± 0.005 μm/h, 0.211 ± 0.004 μm/h, 0.160 ± 0.014 μm/h, 0.199 ± 0.018 μm/h. It can be explained by the difference in volume density of the coatings and thermal conductivity of the gas mixtures caused by changes in reactive gas concentration [3].

Results of cellular studies of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) are represented in Figure.



Results of the cellular studies: *a* — cellularity, *b* — cell viability

© A. Y. Fedotkin, P. V. Maryin, 2021

* This research was supported by TPU development program. The authors are grateful to L. S. Litvinova and the staff of the Immanuel Kant Baltic Federal University for carrying out cell research.

The total number of cells cultured on the surface of the coatings increases with increasing N_2 content in the chamber until the volume ratio Ar/N_2 is 1/1 (figure). With a further increase in the N_2 content in the chamber, the number of cells gradually decreases.

Number of living cells increases with increasing N_2 in the chamber until the volume ratio Ar/N_2 = 1/1 is reached in the chamber and decreases with a further increase (fig. 1b). Thus, coatings of the $Ar50/N_250$ group are characterized by the best indicators of the cellularity and viability of MMSCs.

Conclusion

With an increase in the N_2 content in the chamber and, accordingly, the NO concentration, an increase in the cellularity and viability of MMSCs cultivated on the coating surface is observed until the Ar/N_2 ratio in the chamber reaches 1/1. However, a further increase in N_2 in the chamber and NO in the coating leads to a decrease in these parameters. This is confirmed by the literature [1], which states that high concentrations of NO can lead to cytotoxic reactions.

References

1. Leitinger N., Oguogho A., Rodrigues M. et al. The effect of NO/EDRF and monocytes/macrophages on LDL-oxidation // J. Physiol. Pharmacol. 1995. Vol. 46. P. 385–408. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770784.

2. Fedotkin A. Y., Maryin P. V., Miklashevich L. A. et al. Fabrication of NO-containing calcium phosphate coatings via direct introduction of argon-nitrogen-mixtures applied in reactive RF-magnetron sputtering // J. Phys. Conf. Ser. 2021. doi:10.1088/1742-6596/1954/1/012007.

3. Neidhardt J., Högberg H., Hultman L. Cryogenic deposition of carbon nitride thin solid films by reactive magnetron sputtering. Suppression of the chemical desorption processes // Thin Solid Films. 2005. Vol. 478. Iss. 1–2. P. 1–360. doi:10.1016/j.tsf.2004.09.055.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ МЕТКИ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ОТСЛЕЖИВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ*

К. А. Федотов [1,2], В. В. Ода [1], С. С. Водопьянов [1,3], К. И. Зайчатникова [3], А. С. Семкина [2], Т. Р. Низамов [1], А. Н. Габашвили [1], М. А. Абакумов [1,2]

[1] *Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва*
[3] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E-mail: cfvallwork@gmail.com

Аннотация

Получена генетически модифицированная клеточная линия карциномы молочной железы мыши со стабильной экспрессией генов, кодирующих наноконтейнерную систему, которая состоит из белковой оболочки и грузового белка-фермента, окисляющего Fe^{2+} до Fe^{3+} с образованием магнитных наночастиц внутри белковых оболочек. Полученная клеточная линия позволит с помощью МРТ осуществлять долгосрочный неинвазивный мониторинг опухолевых клеток *in vivo*.

Введение

За 2020 год в мире от рака молочной железы умерло 684 тыс. женщин. Основной причиной этих смертей являлись метастазы. Пятилетняя выживаемость женщин с метастатическим раком молочной железы составляет всего 28 % [1]. В большинстве исследований модели прогрессирования карциномы молочной железы изучают рост первичных опухолей, процесс метастазирования исследуют намного реже [2]. Поэтому актуальной задачей является создание новых меток для неинвазивного мониторинга метастаз карциномы молочной железы в течение продолжительного времени.

В работе представлена генетически кодируемая метка для опухолевых клеток на основе белка-инкапсулина из бактерии *Quasibacillus thermotolerans* (Qt), состоящего из оболочки диаметром 42 нм и загруженного в оболочку белка-фермента, описанного в аннотации. Данная система способна депонировать около 30 000 атомов железа в форме наночастиц внутри белковой оболочки [3]. Также для увеличения активности транспорта железа в клетки был встроен ген белка-переносчика ионов двухвалентных металлов. Модифицированные клетки получили название 4T1-Qt.

Материалы и методы

Клетки культивировали по стандартной методике. Лентивирусы нарабатывали в клетках линии HEK293T, трансфекцию проводили реагентом Lipofectamine 3000 согласно инструкции. Трансдукцию клеток 4T1 полученными вирусами осуществляли по общепринятому протоколу с использованием полибрена (8 мкг/мл). Далее проводили селекцию на пуромицине. Для подтверждения наличия нужных трансгенов проводили ОТ-ПЦР. Магнитную фракцию клеток выделяли после инкубации 4T1-Qt с солью Мора ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, 4 мМ) с помощью набора Octo-MACS. Жизнеспособность магнитных клеток после инкубации с различными концентрациями соли Мора оценивали с помощью MTS-теста. Чтобы качественно оценить накопление железа магнитные клетки окрашивали по Перлсу. Концентрацию накопленного железа в осадках магнитных клеток, растворенных в азотной кислоте, измеряли при помощи метода атомно-эмиссионной спектроскопии. Для измерения эндогенных наночастиц получали ПЭМ изображения ультратонких срезов магнитных клеток 4T1-Qt. Клетки приживляли самкам мышей линии BALB/c гетеротопически по 2 опухоли на 1 животное (1 млн клеток в 50 мкл PBS++ на опухоль). Распределение магнитных клеток в организме животного в процессе роста опухоли и ее метастазирования исследовали с помощью МРТ на 7, 14, 21 и 28-е сутки после подсадки опухолей.

Результаты

В полученных клетках 4T1-Qt с инкапсулиновыми системами успешно происходит биоминерализация железа с образованием магнитных наночастиц со средним размером 32 ± 4 нм (по данным ПЭМ). Соль Мора в концентрации до 4 мМ не обладает токсическим действием в отношении магнитных клеток 4T1-Qt. Также выяснили, что магнитная фракция клеток 4T1-Qt не иммуногена при приживлении мышам. Магнитные наночастицы в инкапсулинах позволяют визуализировать клетки методом МРТ *in vitro* и *in vivo*.

© К. А. Федотов, В. В. Ода, С. С. Водопьянов, К. И. Зайчатникова, А. С. Семкина, Т. Р. Низамов, А. Н. Габашвили, М. А. Абакумов, 2021

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-00096 (https://rscf.ru/project/21-75-00096/).

Генетически модифицированная опухолевая клеточная линия с эндогенными магнитными наночастицами 4T1-Qt является интересным кандидатом для экспериментов по неинвазивному мониторингу злокачественных клеток в организме.

Литература

1. Sung H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA: a cancer journal for clinicians. 2021. Vol. 71. № 3. P. 209–249.

2. Yang L. et al. Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer // Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2020. Vol. 47. № 1. P. 105–116.

3. Giessen T. W. et al. Large protein organelles form a new iron sequestration system with high storage capacity // Elife. 2019. Vol. 8. P. e46070.

ОСОБЕННОСТИ КИСЛОРОДНОГО РЕЖИМА ВОДЫ С ЖИВУЩЕЙ В НЕЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКОЙ ПРИ ЕЕ ВЫРАЩИВАНИИ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Т. А. Филатова, А. А. Зернышкина

Балаковский инженерно-технологический институт — филиал НИЯУ МИФИ

E-mail: rainbow.unicorn8@yandex.ru

Аннотация

Медицинские пиявки в процессе своей жизнедеятельности активно потребляют кислород, в результате чего его содержание в воде стремительно падает до экстремально низких значений. Выдвинуто предположение о взаимосвязи поведения пиявки с концентрацией растворенного кислорода в воде.

Медицинские пиявки (МП) широко применяются в медицине и фармацевтике. Так, например, очень популярен метод лечения укусами пиявок — гирудотерапия — для лечения множества заболеваний (гинекологических, сердечно-сосудистых, неврологических и пр.). В результате укуса МП выделяют в кровь человека целый комплекс биологически активных веществ, в том числе наиболее важный из них — гирудин (отсюда и название метода), благотворно влияющих на здоровье человека. Кроме того, кровопускание за счет МП также оказывает положительный эффект. В фармацевтике используется экстракт МП, так называемый лиофилизат (замороженная, измельченная и высушенная МП), который добавляют в кремы, зубные пасты, мази, свечи и пр.

Ежегодно спрос на МП растет. Но отлов пиявок из природы запрещен, так как массовый их вылов привел к снижению популяции, поэтому МП занесены в Красную книгу. В нашей стране на данный момент существуют четыре предприятия по выращиванию МП в искусственных условиях. Процесс выращивания имеет ряд особенностей и сложностей и характеризуется существенными недостатками, такими как большая гибель пиявок (до 40 %), множество болезней (в виде перетяжек, отсутствия активности), трудность получения потомства от второго поколения и пр.

Основным местом обитания МП является вода, качество которой напрямую влияет на здоровье и жизнь пиявки. Кроме того, МП — живой организм, активно потребляющий кислород. Поэтому целью данной работы являлось исследование особенностей кислородного режима воды с живущей в ней МП при моделировании производственного процесса выращивания в лабораторных условиях.

Для эксперимента были взяты восточные медицинские пиявки вида Hirudo medicinalis orientalis, возраст 1,5 года, в количестве 25 шт., массой 1,5 г, спустя 5 дней кормления. МП помещались в пластмассовые контейнеры с расходом воды 50–80 мл на 1 г МП. Частота смены воды — 1 раз в три дня, температура окружающей среды — 22–23 °С.

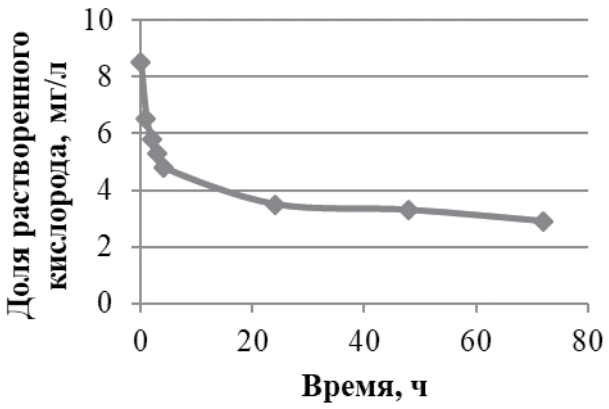


График изменения концентрации растворенного кислорода в воде с живущей в ней медицинской пиявкой

В ходе эксперимента (сразу же после помещения пиявок в воду) ежечасно (в течение первых 4 ч) и ежесуточно (на протяжении 3 суток) анализировалась концентрация растворенного кислорода (РК) и регистрировалось поведение МП. Результаты эксперимента приведены на рисунке.

Сразу же после помещения МП в воду доля РК резко падает: уже в течение первого часа на 2 единицы (с 8 до 6 мг/л), при этом все МП спокойно лежат на дне. После двух часов содержания МП доля РК упала ниже 6 мг/л (5,8 мг/л) и уже 10 % МП поднялись со дна на поверхность, остальные (примерно 30 %) совершали волнообразные движения, что, вероятно, связано с искусственной прокачкой кислорода воды телом в связи с его нехваткой. Через 3 ч доля РК составила 5,3 мг/л. Спустя первые сутки, а также на вторые-третьи сутки доля РК

© Т. А. Филатова, А. А. Зернышкина, 2021

составляла примерно 3 мг/л и половина пиявок находилась у поверхности, остальная часть совершала на дне активные волнообразные движения.

Таким образом, нами замечена связь между концентрацией растворенного в воде кислорода и поведением медицинской пиявки. Анализ литературы по содержанию аквакультуры (различных видов рыб) устанавливает норматив по доле РК не ниже 6 мг/л. Данное исследование показало, что уже спустя два часа содержания пиявок в воде доля кислорода становится ниже 6 мг/л и далее достигает экстремально низких концентраций (3–4 мг/л). Таким образом, предварительно можно заключить о необходимости контроля динамики кислородного режима при выращивании МП и исследования последствий его влияния на здоровье и жизнь МП.

РАЗРАБОТКА ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЕННОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА МАЛОГО ДИАМЕТРА В УСЛОВИЯХ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НАПРЯЖЕНИЕМ СДВИГА

М. Ю. Ханова

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово

E-mail: khanovam@gmail.com

Аннотация

Исследование посвящено разработке сосудистого протеза малого диаметра с непрерывной эндотелиальной выстилкой, с применением аутологичных биоматериалов и в условиях прекондиционирования напряжением сдвига.

Материал и методы

Методом электроспиннинга из 10%-ного поликапролактона (PCL) и 5%-го полигидроксибутирата/валерата (PHBV) изготовлены трубчатые PHBV/PCL-каркасы на установке Nanon-01A. Полимерные каркасы модифицировали погружением в фибриноген, полимеризацию фибрина индуцировали нанесением тромбино-кальциевой смеси. Культуру колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) получали культивированием мононуклеарной фракции из крови пациентов с ишемической болезнью сердца в питательной среде EGM-2MV, с 5%-м содержанием FBS. Полимерные каркасы заселяли суспензией КФЭК в концентрации 700 тыс./мл на 1 см^2. Протезы PHBV/PCL/фибрин/КФЭК культивировали в течение 2 суток в статических условиях, затем образцы переносили в систему проточного биореактора и культивировали 5 суток, с напряжением сдвига 2,85 дин/см^2. Группу сравнения составили аналогичные сосудистые протезы, культивируемые в статических условиях. Структуру внутренней поверхности изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Жизнеспособность эндотелиальных клеток исследовали флуоресцентным окрашиванием DAPI/EtBr. С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии детектировали F-actin, Talin, CD31, CD309, vWF, ядра окрашивали DAPI. Количественный анализ изображений проводили в программе ImageJ. Для полнотранскриптомного секвенирования была выделена тотальная РНК с помощью Purelink RNA Micro Scale Kit. ДНК-библиотеки формировали с помощью набора SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit и анализировали их качество с помощью набора High Sensitivity DNA Kit на приборе Bioanalyzer 2100. Количественный ПЦР-анализ ДНК-библиотек осуществляли на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad), секвенировали на платформе HiSeq 2000 (Illumina). Статистический анализ результатов проведен в программе Graf Pad Prizm7.

Результаты

По результатам СЭМ и флуоресцентной микроскопии выявлено благоприятное влияние фибринового покрытия, которое способствовало удержанию клеток в динамических условиях культивирования, кроме того, выбранная интенсивность напряжения сдвига не оказывала пагубного воздействия на плотность заселения КФЭК и их жизнеспособность (100 %) независимо от условий культивирования, $p < 0{,}05$. Количественный анализ снимков, полученных с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии, продемонстрировал увеличение экспрессии белков эндотелиального профиля — CD31, CD309, vWF — при культивировании в условиях пульсирующего потока, $p < 0{,}05$. Также под влиянием напряжения сдвига увеличилась экспрессия белка фокальной адгезии Talin и структурного белка F-actin. Помимо этого, наблюдалась смена хаотично направленных микрофиламентов F-actin на преимущественную ориентацию в направлении потока. Подобные изменения являются характерными, отражают адаптацию КФЭК к пульсирующему потоку и способствуют формированию устойчивой адгезии. При исследовании транскриптома КФЭК было выделено 185 значимых дифференциально экспрессируемых гена, которые были аннотированы с помощью базы данных Gene Ontology. Под влиянием напряжения сдвига в КФЭК произошло повышение экспрессии генов, обеспечивающих развитие кровеносных сосудов, стимулирующих ангиогенез, определяющих пролиферацию, миграцию и регуляцию целостности эндотелия.

© М. Ю. Ханова, 2021

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИДЕОАНАЛИЗА В ИЗУЧЕНИИ ХАРАКТЕРА СОКРАЩЕНИЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

Л. С. Харитонов

Арзамасский политехнический институт (филиал)
Нижегородского государственного технического университета им. Р. Е. Алексеева

E-mail: leo.khariton@yandex.ru

Аннотация

Описывается алгоритм проведения анализа видеозаписи сокращения ткани сердечной мышцы под микроскопом средствами системы компьютерной алгебры Wolfram Mathematica. Было проведено измерение характера сокращения миокарда и картирование областей сжатия и сокращения.

Видеоанализ (англ. Motion capture) занимается записью, обработкой и анализом видеоданных, содержащих различного рода движения. Он применяется для решения многих научных и прикладных задач, но самое широкое распространение получил в биомедицинской инженерии, кино, мультипликации и компьютерных играх. Так, для тканевой инженерии [1] очень актуальной является задача картирования возбуждений и сокращений клеток живой сердечной ткани и создание подробных моделей.

Проанализируем видеозапись [2] сокращения ткани сердечной мышцы под микроскопом, которая была сделана в Институте прикладной синтетической химии Венского технического университета (Technische Universität Wien) совместно с Венским медицинским университетом, и измерим характер движений и сокращений, а также выполним картирование сердца. Для решения данной задачи воспользуемся программным пакетом Wolfram Mathematica. После импорта видеозаписи в систему Mathematica для удобства вычислений извлечем из него видеоклип, состоящий из 60 кадров (извлекались кадры с 520 по 580, на которых как раз было изображено сокращение миокарда). Далее определим локальные вертикальные и горизонтальные сдвиги (смещения) от одного кадра к другому с помощью функции ImageDisplacements. Она сравнивает два последовательных кадра и возвращает матрицу смещений $\{\delta_x, \delta_y\}$ для каждого пикселя кадра первого кадра. Затем упорядочим поток данных с использованием фильтра Гаусса (GaussianFilter), который используется для сглаживания изображений и уменьшения шумов, и визуализируем векторное поле движения сердечной ткани, отображая его в виде векторной диаграммы, наложенной поверх анимации, с помощью функции ListVectorPlot (рис. 1).

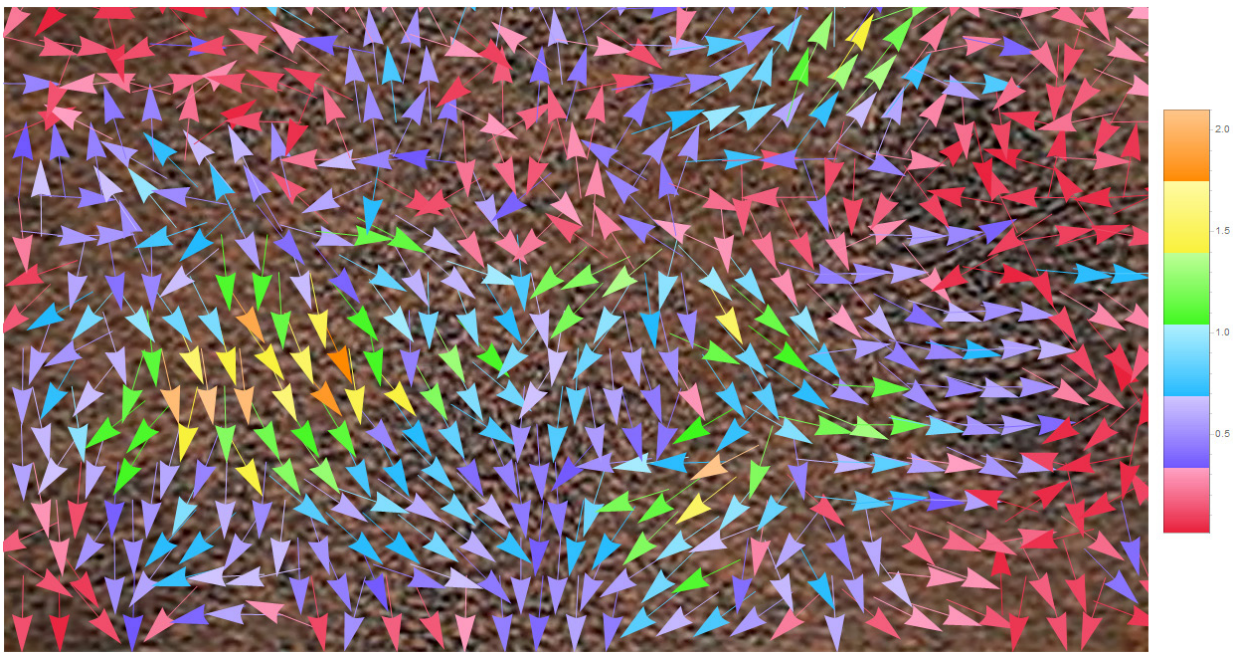


Рис. 1. Кадр с отображением векторного поля движения сердечной мышцы. Цвет вектора указывает на величину видеопотока, стрелкой показано направление смещения

© Л. С. Харитонов, 2021

Далее для определения пульса запишем в память массив данных, содержащий величины потока в каждом кадре анимации, и найдем кадры с пиковым потоком с помощью директивы FindPeaks. Визуализируем пульс в виде графика, используя функцию ListLinePlot. Как видно, график (рис. 2) очень схож с кардиограммой (заметны все соответствующие зубцы). Определим также частоту сердечных сокращений в минуту, взяв среднее значение. Это примерно 80 уд./мин.

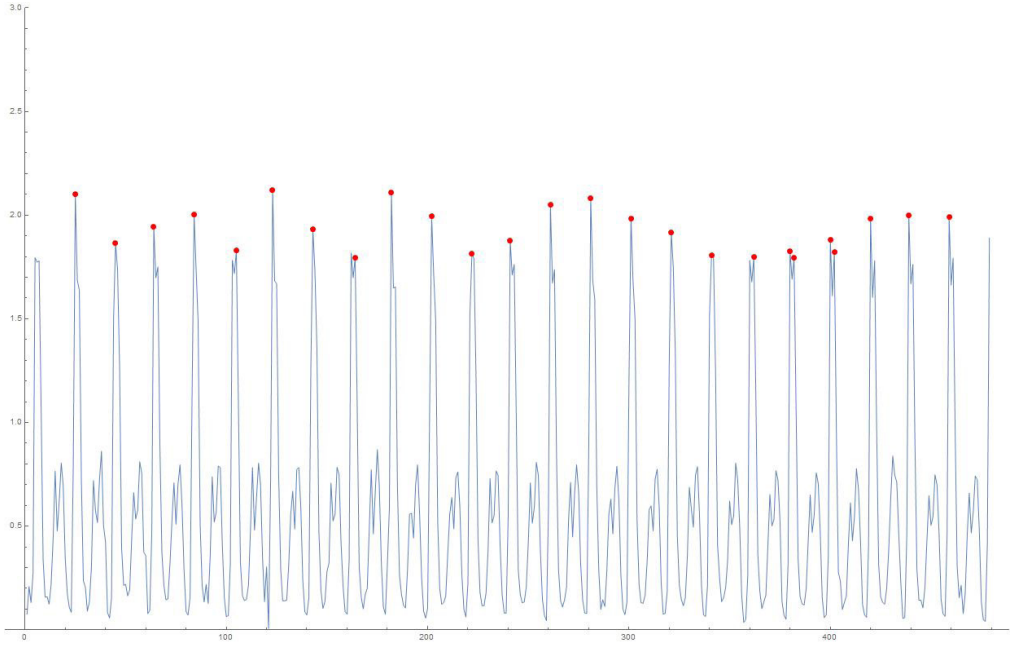


Рис. 2. График, отображающий сокращения миокарда. Красными точками отмечены пиковые значения

Для того чтобы картировать зоны сокращения и расширения, вычислим дивергенцию поля видеопотока, задавая для этого отдельную функцию. Затем выделим на анимации области расширения красным цветом, а области сжатия — синим, накладывая цвета поверх анимации и комбинируя их в цветовом пространстве LAB с использованием функции ColorCombine (рис. 3). Она обычно используется для объединения нескольких одноканальных изображений в одно многоканальное изображение. Для более корректного отображения окрашивания зон сжатия и сокращения кадры анимации были переведены в черно-белое цветовое пространство.

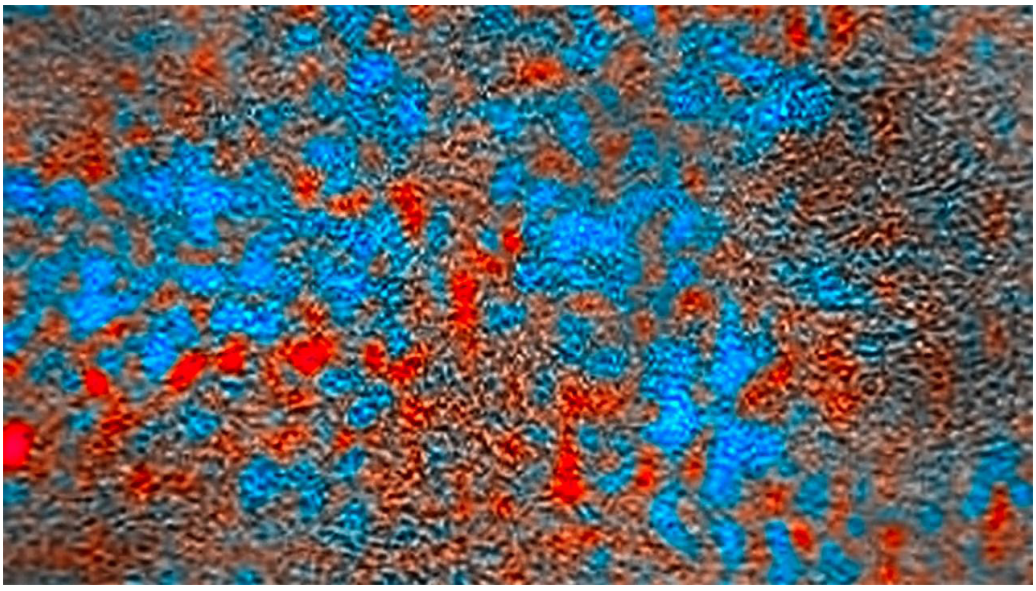


Рис. 3. Картирование сердца. Кадр с выделенными областями сжатия (синим цветом) и областями расширения (красным цветом)

Литература

1. Цвелая В. А. Тканевая инженерия сердца как средство исследования фундаментальных процессов возникновения реентри: дис. … канд. биол. наук. Долгопрудный, 2019. 164 с.

2. YouTube. The Heart in the Petri Dish. URL: https://www.youtube.com/watch?v=a88NkD1eu2Q&list=TLw4LzcRMzKzY (дата обращения: 28.08.2021).

О РОЛИ ФОСФАТАККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

А. А. Хасанова, Е. В. Перушкина, А. Р. Хабибуллина, И. С. Хафизова, А. С. Сироткин

Казанский национальный исследовательский технологический университет

E-mail: hasanovaaigyl@mail.ru

Аннотация

Исследован биоценоз активного ила городских очистных сооружений и консорциум фосфатаккумулирующих бактерий в его составе. В модельном эксперименте проанализирована активность микробной дефосфатации и рост выделенных культур.

Биологический метод удаления фосфат-ионов из сточных вод реализуется с применением одной из современных технологий EBPR (Enhanced biological phosphorus removal), характеризующейся рециркуляцией биомассы в анаэробных и аэробных зонах реактора (Günther S., 2009). Микроорганизмы, которые участвуют в рассматриваемом процессе, относят к фосфатаккумулирующим бактериям активного ила: рр. *Acinetobacter, Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus, Accumulibacter* и другие [1].

На территории Российской Федерации часто используется аэробная биологическая очистка сточных вод с концентрацией растворенного кислорода в аэротенках до 4 мг/дм^3. В связи с отсутствием анаэробных и аноксидных зон эффективность микробной дефосфатации не превышает 50 % [2]. Интенсификация существующих технологических схем предполагает анализ активности фосфатаккумулирующих бактерий и оценку влияния внешних факторов на их развитие.

Особый интерес представляет диагностика состояния микробного сообщества при традиционном методе очистки. В результате проведения морфологического анализа активного ила биологических очистных сооружений г. Зеленодольск Республики Татарстан экспериментально были обнаружены кругоресничные инфузории *Peritricha*, *Aspidisca costata, Opalina, Notommata ansata, Rotathria marcoceria, Calthypha luna, Carchesium spectabile, Epistylis plicatilis, Nematoda, Bodo* и др. Известно, что высокое содержание *Aspidisca costata,* присутствие инфузорий рода *Epistylis* и круглых червей *Nematoda* свидетельствуют о благоприятных условиях для развития микробного сообщества и высокой степени очистки сточных вод. Инфузории отряда *Peritricha* (*Vorticella convallaria* и другие), коловратки (*Notommata*) характеризуют диффузию кислорода из воды в активный ил. Однако при залповых концентрациях фосфатов требуется повышение эффективности дефосфатации с достижением требуемых нормативных значений 0,2 мг/дм^3.

Для усовершенствования работы очистных сооружений следует учитывать, что фосфатаккумулирующие бактерии находятся в ассоциации с гликогенаккумулирующими и денитрифицирующими микроорганизмами. Выделение культур осуществляли в модельном эксперименте на разработанной авторами лабораторной установке с чередованием режимов аэрации на питательной среде ПС$_1$ [3]. Получен консорциум фосфатаккумулирующих бактерий РА25, в котором доминируют одиночные грамотрицательные кокки и грамположительные палочки с прямыми концами.

В процессе эксперимента на модельной питательной среде ПС$_2$ [3] при отсутствии аэрации концентрация фосфатов возрастает на 67 %, что свидетельствует о способности выделенных микроорганизмов к внутриклеточной аккумуляции полифосфатов. Развитие бактерий РА25 на питательной среде ПС$_2$ приводит к незначительному приросту биомассы в культуральной жидкости по сравнению с ПС$_1$ (см. таблицу).

Показатели оптической плотности микробной суспензии РА25 (D_{490}, опт. ед.)

	Продолжительность культивирования, ч		
	0	24	48
ПС$_1$	0,018	0,254	0,244
ПС$_2$	0,004	0,023	0,254

Модельная питательная среда ПС$_2$ характеризуется отсутствием источника факторов роста (дрожжевого экстракта), нитратов и нитритов, в результате чего рост консорциума микроорганизмов РА25 замедляется. Однако содержание важных кофакторов (ионов Mg^{2+}, K^+, Co^{2+}, Ni^{2+} и Cu^{2+}) в его составе стимулирует накопление полифосфатов в клетках бактерий и удаление избыточного количества фосфатов из сточных вод.

© А. А. Хасанова, Е. В. Перушкина, А. Р. Хабибуллина, И. С. Хафизова, А. С. Сироткин, 2021

Литература

1. Жмур Н. С. Интенсификация процессов удаления соединений азота и фосфора из сточных вод. М.: Акварос, 2001. 96 с.

2. Мудрецова-Висс К. А., Кудряшова А. А., Дедюхина В. П. Микробиология, санитария и гигиена. Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. 312 с.

3. Хасанова А. А. Выбор параметров культивирования фосфатаккумулирующих микроорганизмов активного ила. Уфа, 2020. 182–190 с.

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ *E. COLI* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЕПТИДОВ

З. Р. Хасаншина, И. А. Корнаков, С. А. Ищук, А. В. Казакова, В. И. Шмурак, В. Ф. Латыпов

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

E-mail: zuhra.hasanshina@geropharm.com

Аннотация

Целью работы являлась разработка эффективных штаммов *E. coli* для производства четырех пептидов с использованием тега 6HIS-SUMO. Исследование включало в себя дизайн генетических конструкций, получение штаммов-продуцентов, анализ подлинности SUMO-пептидов и пептидов. В результате были получены 4 штамма-продуцента. Подлинность SUMO-пептидов и пептидов подтверждена ВЭЖХ-МС.

В настоящее время одобрено 60 пептидных препаратов, сотни проходят клинические испытания [1, 2]. В основном их получают химическим синтезом. Однако с увеличением количества аминокислот (более 20) синтез усложняется.

Так как большинство пептидов не содержат посттрансляционных модификаций, для их получения можно использовать бактериальные системы экспрессии [2, 3]. Однако эффективных векторов для получения пептидов в литературе не описано [2, 3].

Экспрессия коротких пептидов ограничена цитотоксичностью и протеолитической деградацией [4, 5]. Слияние пептидов с белком-партнером является эффективным способом устранения данных недостатков. Использование тега SUMO является предпочтительным, так как ULP-протеаза эффективно удаляет метку, не оставляя нецелевые аминокислоты на N-конце целевого белка [4, 5].

Целью настоящей работы являлась разработка эффективных штаммов-продуцентов пептидов с использованием технологии SUMO.

Дизайн праймеров и плазмид осуществляли с помощью программы Vector NTI Advanced 11.5. Оптимизация кодонов и синтез ДНК-последовательности были выполнены компанией ATUM (США). В качестве основы для вектора использовали плазмиду pBR322 (Thermo Fisher Scientific). Структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием (ЗАО «Евроген»).

Последовательности SUMO и пептидов получали с помощью ПЦР, очищенные фрагменты гидролизовали эндонуклеазами рестрикции EcoRI, HindIII, BseRI. Далее проводили реакцию лигирования с использованием T4-ДНК-лигазы.

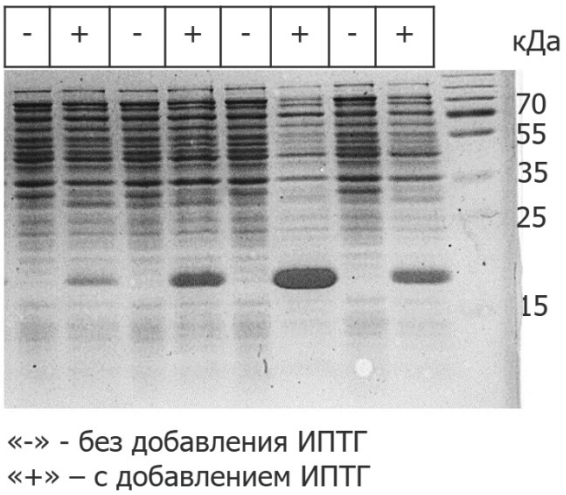


Рис. 1. Электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* BL21, содержащих плазмиды, несущие ген SUMO-пептидов, в 15 % Trisine-SDS-PAGE

Полученными плазмидами трансформировали штамм-хозяин BL21 методом электропорации. Штаммы-продуценты культивировали на среде с канамицином. Экспрессию целевых белков индуцировали добавлением ИПТГ и проводили в течение 4 часов. SUMO-пептиды были очищены Ni-аффинной хроматографией. Далее элюат гидролизовали ULP-протеазой.

В результате разработки были получены 4 стабильных и эффективных штамма-продуцента коротких пептидов с различными физико-химическими характеристиками:

- 22–36 аминокислот;
- 2,5–4 кДа;
- pI 4–9.

На рис. 1 представлена электрофореграмма общего клеточного белка штаммов-продуцентов пептидов. Данные, представленные на рис. 2, хорошо иллюстрируют результаты ферментативного гидролиза: полосы, соответствующие исходному белку (I), уменьшаются, в то время как появляются полосы, соответствующие отщепленному SUMO и пептиду (II).

© З. Р. Хасаншина, И. А. Корнаков, С. А. Ищук, А. В. Казакова, В. И. Шмурак, В. Ф. Латыпов, 2021

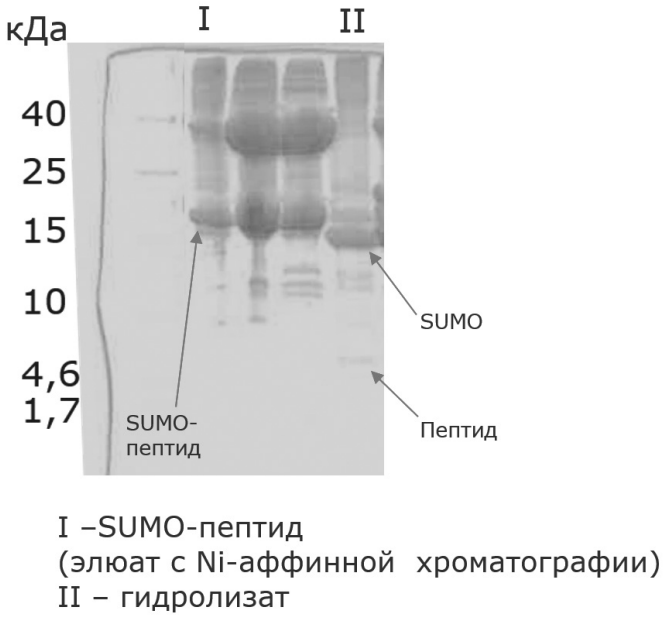


Рис. 2. Электрофореграмма SUMO-пептида после аффинной хроматографии и после гидролиза ULP-протеазой в 15 % Tricine-SDS-PAGE

В результате проведенного исследования было разработано 4 эффективных штамма-продуцента пептидов. Молекулярная масса всех SUMO-пептидов и пептидов была подтверждена с помощью ВЭЖХ-МС.

Литература

1. Wegmuller S., Schmid S. Recombinant peptide production in microbial cells // Current Organic Chemistry. 2014. Vol. 18. № 8. P. 1005–1019.

2. Apostolopoulos V. et al. A global review on short peptides: frontiers and perspectives // Molecules. 2021. Vol. 26. № 2. P. 430.

3. Koutsopoulos S. Peptide applications in biomedicine, biotechnology and bioengineering. Woodhead Publishing, 2017.

4. Zorko M. et al. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2009. Vol. 1788. № 2. P. 314–323.

5. Jin F. et al. Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, Pichia pastoris // Protein expression and purification. 2006. Vol. 49. № 1. P. 39–46.

ФЕРМЕНТАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНАЛОГОВ МОЛОКА МОЛОЧНОКИСЛЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

А. М. Холдина

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E-mail: annahold@yandex.ru

Аннотация

Целью исследования являлся поиск новых штаммов микроорганизмов, способных ферментировать растительные аналоги молока. В ходе работы было выделено и идентифицировано 27 штаммов молочнокислых бактерий. Оценены параметры сбраживания ими соевого и кокосового молока, отмечены штаммы, показавшие лучшие результаты. В дальнейшем планируется более подробное изучение характеристик выделенных штаммов как стартовых культур для создания растительных «кисломолочных» продуктов.

Последние годы все больше внимания уделяется изучению растительных аналогов молока. Это связано с необходимостью создавать продукты, которые подходят для людей, не употребляющих молочные продукты в силу различных причин. При этом важное место в рационе человека занимают кисломолочные продукты, которые способствуют поддержанию нормального состояния кишечной микробиоты. Для таких людей альтернативой могут служить продукты ферментации растительного происхождения, в том числе «кисломолочные» продукты на основе растительных заменителей молока. Использование разных штаммов микроорганизмов, эффективно ферментирующих растительное «молоко», может способствовать улучшению органолептических и пробиотических свойств таких продуктов.

Данная работа посвящена выделению бактерий, пригодных для ферментации растительного «молока». В качестве источников для поиска микроорганизмов использовали продукты соления и квашения, такие как соленые огурцы, квашеные капуста и свекла, отобранные в трех регионах Российской Федерации. Выделение чистых культур микроорганизмов проводилось с использованием питательной среды MRS agar (HiMedia), далее штаммы были идентифицированы с помощью MALDI-TOF MS. Для оценки пригодности выделенных штаммов к сбраживанию растительного молока исследовались такие параметры ферментации, как прирост титра микроорганизмов, повышение кислотности, органолептические свойства ферментированного «молока». В качестве субстратов для ферментации использовались соевое и кокосовое молоко. Ферментация велась при температуре 37 °C в течение 24 часов для соевого молока и 48 часов для кокосового молока.

Было выделено 27 штаммов микроорганизмов, 19 из которых наиболее вероятно принадлежали роду *Lactobacillus*, 5 — роду *Leuconostoc*, 2 — роду *Enterococcus*, 1 — *Pediococcus*. Для ферментации соевого молока использовались штаммы S1–S13, штаммы S14–S27 ферментировали кокосовое молоко. Для продуктов ферментации соевого молока показатели кислотности находились в диапазоне от 19 до 57 °T, для кокосового — от 25 до 141 °T при начальных значениях 17 и 19 °T соответственно. Максимальный прирост титра за время ферментации наблюдался для *Lactobacillus* sp. S9, *L. plantarum* S11 (для ферментации соевого молока) и *L. fermentum* S15, *L. plantarum* S22 (при культивировании на кокосовом молоке) — $9{,}4\times10^2$, $2{,}9\times10^2$, $2{,}2\times10^3$ и $1{,}0\times10^3$ КОЕ/мл соответственно. Наиболее приятные органолептические свойства удалось получить при ферментации с использованием *L. plantarum* S11, *L. plantarum* S13, *L. plantarum* S16, *Lc. mesentroides* S19, *E. faecium* S21, *L. plantarum* S26, *Lc. mesentroides* S27. Исходя их полученных данных для последующей работы были отобраны штаммы с оптимальным набором характеристик ферментации: *L. plantarum* S9, *L. plantarum* S11, *L. plantarum* S16, *Lc. mesentroides* S19, *L. plantarum* S26. В дальнейшем планируется провести секвенирование выделенных штаммов по гену 16S рРНК для точной идентификации и определить их более полные характеристики как стартовых культур.

© А. М. Холдина, 2021

УЛУЧШЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И СИЛИБИНА ПУТЕМ ИХ ВКЛЮЧЕНИЯ В ПОЛИМЕРНУЮ НАНОРАЗМЕРНУЮ СИСТЕМУ ДОСТАВКИ

М. В. Чиркина [1], В. В. Заварзина [2], Н. Г. Яббаров [1], М. Р. Моллаева [1], М. Б. Сокол [1], Е. Д. Никольская [1]

[1] Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва
[2] Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

E-mail: fom.marg@mail.ru

Аннотация

Низкая биодоступность таких гепатопротекторов, как урсодезоксихолевая кислота (UDCA) и силибин (Slb), значительно ограничивает их применение для патогенетической терапии печени и желчевыводящих путей. Для решения данной проблемы была проведена работа по включению UDCA и Sib в полимерную матрицу с помощью метода нанопреципитации. *In vitro* эксперименты показали более высокую гепатопротекторную активность (в 1,5–2 раза) полимерных частиц по сравнению с индивидуальными субстанциями.

Среди гастроэнтерологических заболеваний наиболее часто встречаются патологии печени и желчевыводящих путей. Использование гепатопротекторов (Slb, UDCA) — препаратов для борьбы с данными патологиями — сопряжено с такими трудностями, как низкая биодоступность, малая растворимость в воде и плохая всасываемость в кишечнике. Целью данной работы была разработка способов увеличения биодоступности этих гепатопротекторов путем включения в полимерные наночастицы.

Были проведены эксперименты по разработке метода включения Slb и UDCA в полимолочную кислоту (PLA) и сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) с различным соотношением мономерных звеньев. Полимерные формы с UDCA и Slb получали с помощью УЗ- или погружного гомогенизатора, а также методом нанопреципитации. Для определения оптимального состава полимерной композиции исследовали влияние различных параметров (табл. 1) на физико-химические свойства частиц (табл. 2).

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: использование УЗ-гомогенизатора по сравнению с погружным способствует уменьшению среднего диаметра частиц и увеличению общего содержания ДВ; снижение концентрации поливинилового спирта (ПВС) способствует уменьшению среднего диаметра частиц; увеличение соотношения водной и органических фаз также способствовало уменьшению размера частиц, однако при этом значительно снижалось общее содержание ДВ; при увеличении соотношения «ДВ : полимер» наблюдалось уменьшение размера и увеличение содержания ДВ; использование метода нанопреципитации позволило получить частицы меньшего диаметра с сохранением общего содержания ДВ.

Таблица 1

Подбор параметров метода полученных наночастиц

Партия частиц	Обработка[a]	ПВС (%)	О / W[b]	ДВ: полимер[c]	Полимер	Растворитель
Полимерные формы Sib						
Sib-l[d]	-	0,5	1 : 5	1 : 5	PLGA-COOH 50/50	Ацетон
Sib-2	УЗ	0,5	1 : 5	1 : 5	То же	Ацетон
Sib-3	УЗ	1	1 : 5	1 : 5	»»	Ацетон
Sib-4	УЗ	2	1 : 5	1 : 5	»»	Лис-юн
Sib-5	УЗ	0,5	1 : 10	1 : 5	»»	Ацетон
Sib-6	УЗ	0,5	1 : 5	1 : 10	»»	Ацетон
Sib-7[e]	НП[e]	0,5	1 : 5	1 : 10	»»	DMSO
Sib-8[e]	То же	0,5	1 : 5	1 : 10	»»	Ацетон-метанол (3:2)
Sib-9[e]	»»	0,5	1 : 5	1 : 10	»»	Ацетон
Sib-10[e]	»»	0,5	1 : 5	1 : 10	PLGA 50/50	Ацетон
Sib-11[e]	»»	0,5	1 : 5	1 : 10	PLGA 75/25	Ацетон
Sib-12[e]	»»	0,5	1 : 5	1 : 10	PLA	Ацетон

© М. В. Чиркина, В. В. Заварзина, Н. Г. Яббаров, М. Р. Моллаева, М. Б. Сокол, Е. Д. Никольская, 2021

Окончание табл. 1

Партия частиц	Обработка[a]	ПВС (%)	О / W[b]	ДВ: полимер[c]	Полимер	Растворитель
Полимерные формы VDCA						
UDCA-l[d]	–	0,5	1:5	1:5	PLGA-COOH 50/50	Ацетон
UDCA-2	УЗ	0,5	1:5	1:5	То же	Ацетон
UDCA-3	УЗ	1	1:5	1:5	»»	Ацетон
UDCA-4	УЗ		1:5	1:5	»»	Ацетон
UDCA-5	УЗ	0,5	1:10	1:5	»»	Ацетон
UDCA-6	УЗ	0,5	1:5	1:10	»»	Ацетон
UDCA-7	НП*	0,5	1:5	1:10	»»	DMSO
UDCA-8[e]	То же	0,5	1:5	1:10	»»	Ацетон-метанол (3:2)
UDCA-9[e]	»»	0,5	1:5	1:10	»»	Ацетон
UDCA-11[e]	»»	0,5	1:5	1:10	PLGA 50 50	Ацетон
UCA-11[e]	»»	0,5	1:5	1:10	PLGA 75/25	Ацетон
UDCA-12[e]	»»	0,5	1:5	1:10	PLA	Ацетон

[a] УЗ — ультразвуковой гомогенизатор; [b] — отношение «масло : вода»; [c] ДВ — действующее вещество; [d] — использование погружного гомогенизатора; [e] — получение частиц методом нанопреципитации

Таблица 2

Физико-химические характеристики полученных наночастиц

Партия частиц	Средний диаметр /нм	Дзета-потенциал/мВ	ИП	Общее содержание ДВ (мас.%)	Степень включения ДВ (мас.%)
Полимерные формы Sib					
Sib-l[d]	420 ± 1	–17,2 ± 0,8	0,201	4,21	59,5
Sib-2	204 ± 6	–16 ± 1,7	0,110	7,82	45,7
Sib-3	170 ± 4	–19,3 ± 3,2	0,125	5,47	58,9
Sib-4	350 ± 2	–26,4 ± 2,1	0,298	4,75	60,4
Sib-5	140 ± 3	–17,2 ± 0,3	0,138	4,21	50,6
Sib-6	110 ± 7	–15,6 ± 0,5	0,095	9,35	46,7
Sib-7[e]	127 ± 2	–15,1 ± 1,2	0,112	1,16	30,2
Sib-8[e]	251 ± 5	–20,5 ± 2,3	0,140	11,16	15,7
Sib-9[e]	90 ± 6	–18,4 ± 0,9	0,090	7,64	62,5
Sib-10[e]	93 ± 3	–17,8 ± 1,1	0,109	7,38	61,4
Sib-11[e]	102 ± 2	–17,4 ± 1,6	0,132	7,82	63,8
Slb-12[e]	105 ± 4	–17,1 ± 2,2	0,126	7,72	63,3
Полимерные формы UDCA					
UDCA-l[d]	510 ± 2	–16,9 ± 1,2	0,295	0,54	87,2
UDCA-2	265 ± 5	–16,1 ± 0,3	0,126	1,09	85,6
UDCA-3	236 ± 3	–20,1 ± 2,6	0,165	0,66	78,3
UDCA-4	314 ± 7	–27,3 ± 3,5	0,190	0,4»	70,2
UDCA-5	232 ± 2	–16,5 ± 0,7	0,102	0,6S	75,7
UDCA-6	176 ± 4	–17,6 ± 0,9	0,096	1,25	78,1
UDCA-7[e]	278 ± 2	–14,5 ± 0,6	0,132	0,32	40,7
UDCA-8[e]	354 ± 3	–18,7 ± 1,5	0,215	1,43	35,9
UDCA-9[e]	140 ± 6	–17,2 ± 1,3	0,129	1,52	86,7
UDCA-10[e]	142 ± 6	–16,7 ± 1,8	0,136	1,50	86,0
UDCA-11[e]	164 ± 3	–17,9 ± 2,1	0,186	1,6	86,3
UDCA-12[e]	156 ± 4	–15,8 ± 1,7	0,16S	1,62	87,2

Выбранные параметры описывают разработанный метод и позволяют получить частицы с оптимальными физико-химическими характеристиками. По разработанному методу были получены частицы (Slb-10[e];11[e];12[e]; UDCA-10[e];11[e];12[e]) для проведения экспериментов *in vitro* исследования влияния типа полимера на специфиче-

скую активность частиц. Эксперименты по изучению гепатопротекторной активности частиц в сравнении со свободными субстанциями при воздействии токсического агента (CCl_4) показали снижение выживаемости клеток после внесения CCl_4 до 25 % в сравнении с необработанным контролем. Внесение различных полимерных форм продемонстрировало увеличение выживаемости до 60 и 85 %. Полимерные частицы проявляли в 1,5–2,5 раза более высокую гепатопротекторную активность по сравнению с субстанциями в условиях токсического воздействия.

Таким образом, был разработан и оптимизирован метод включения UDCA и Slb в полимерные носители PLGA и PLA с различным соотношением мономерных звеньев. Полученные *in vitro* результаты свидетельствуют о значительном улучшении гепатопротекторной активности Slb и UDCA, включенных в состав полимерных частиц, по сравнению со свободными субстанциями, что позволяет сделать вывод об увеличении их эффективности и биодоступности и дает основание для дальнейшего изучения их гепатопротекторных свойств в экспериментах *in vivo*.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ МЕТИОНИНА В СРЕДЕ*

Т. М. Яньшина, А. В. Сидорин, М. А. Цыганков, А. М. Румянцев

Санкт-Петербургский государственный университет

E-mail: t.grigoreva1999@gmail.com

Аннотация

С помощью методов секвенирования нового поколения на уровне транскрипции была изучена экспрессия генов у дрожжей *Pichia pastoris*, выращенных на средах с добавлением метионина и без него. В результате анализа дифференциальной экспрессии было выявлено 90 генов, транскрипция которых зависит от наличия метионина в среде.

Дрожжи *Pichia pastoris* относятся к группе «признанных безопасными» (GRAS) микроорганизмов и активно применяются в современной биотехнологии в качестве организма-продуцента. Они способны расти в жидких питательных средах простого состава и при этом достигают высокой плотности культуры. При этом в отличие от бактерий эти дрожжи способны осуществлять широкий спектр посттрансляционных модификаций, что важно при синтезе рекомбинантных белков эукариотического происхождения. Дрожжи *P. pastoris* характеризуются наличием сильных и удобных для работы промоторов, которые используются для экспрессии генов интереса. Благодаря этим свойствам *P. pastoris* являются очень эффективной системой синтеза рекомбинантных белков, с помощью которой можно достичь необычайно высоких показателей — вплоть до 15 граммов рекомбинантного белка на литр культуры. На сегодняшний день тысячи разнообразных рекомбинантных белков, синтезируемых с помощью этого вида дрожжей, используются как для исследовательских целей, так и при производстве биофармацевтических препаратов.

В связи с огромной практической значимостью *P. pastoris* как объекта биотехнологии, особенности метаболизма и регуляция активности генов у этих дрожжей активно изучаются. В данной работе впервые был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов у дрожжей *P. pastoris* в зависимости от наличия метионина в среде. Для этого клетки штамма X33 выращивали в жидкой среде с глицерином в качестве источника углерода в средах с метионином и без него. Из клеток выделяли РНК, проводили обогащение по поли(A+)фракции, а затем — синтез кДНК. Полученная кДНК была использована для подготовки библиотек, совместимых с технологией секвенирования Illumina. После контроля качества и оценки количества ДНК пул библиотек был секвенирован на приборе MiSeq Illumina. При анализе полученных результатов проводили выравнивание прочтений на референсный геном дрожжей *P. pastoris* (ASM2700v1 база данных NCBI) при помощи программы hisat-2. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили в пакете R-DESeq2. Анализ генной онтологии проводили при помощи базы данных KOBAS.

В ходе анализа среди более чем 5000 генов известных для дрожжей *P. pastoris* были выявлены те, активность которых (на уровне транскрипции) зависит от наличия метионина в среде. Было обнаружено 37 генов, транскрипция которых подавляется в среде с метионином и 53 гена, которые, наоборот, активируются при наличии метионина в среде.

Поскольку метионин и другие аминокислоты являются важным компонентом биотехнологических сред, используемых при работе с *P. pastoris*, полученные данные важны для оптимизации условий культивирования этих дрожжей-продуцентов. Кроме того, проведенные исследования являются частью проекта, направленного на использование дрожжей *P. pastoris* при обогащении кормовых добавок метионином. Поскольку эта аминокислота незаменима для животных, она является важным компонентом кормов, применяемых в сельском хозяйстве. Одним из способов производства метионина является использование организмов-продуцентов, которое имеет ряд преимуществ перед химическим синтезом. При этом применяются подходы, включающие модификацию метаболических путей для увеличения уровня синтеза метионина или, например, синтез организмом-продуцентом метионинбогатых белков. Результаты исследования позволят модифицировать полученные нами ранее штаммы *P. pastoris* продуцентов метионинбогатого белка и сочетать два подхода по синтезу метионина.

© Т. М. Яньшина, А. В. Сидорин, М. А. Цыганков, А. М. Румянцев, 2021

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-73-10077.

II

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ*

О. О. Бабич, В. В. Ларина, С. Ю. Носкова, С. А. Сухих

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

E-mail: svykrum@mail.ru

Аннотация

Среди многочисленных лекарственных средств, применяемых для сохранения поголовья и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта в мясном скотоводстве, наиболее часто применяют курсовые и кормовые антибиотики, однако длительное и нерациональное их использование снижает резистентность организма к инфекциям. Актуальным и перспективным является использование в качестве кормовых добавок компонентов растительного происхождения — фитогеников (phytogenics).

Число исследований по созданию кормовых добавок, биологически активных веществ (БАВ), которыми можно заменить антибиотики, в мире растет. Это связано с ограничением на применение в сельском хозяйстве стран ЕЭС ряда синтетических стимуляторов роста, относящихся к группе антибиотиков (Antibiotic Growth Promoters).

Перспективным сырьем для получения БАВ антимикробного действия с целью создания кормовых добавок являются лекарственные растения Калининградской области, такие как скумпия кожевенная (Cotinus coggygria), лунник оживающий (Lunaria rediviva), жарновец метельчатый (Sarothamnus scoparius), синеголовник приморский (Eryngium maritimum), гудайера ползучая (Goodyera repens), ладьян трехнадрезанный (Corallorhiza trifida), тайник сердцевидный (Listera cordata), палыдекорник пятнистый (Dactylorhiza inaculata), любка зеленоцветковая (Platanthera chlorantha), любка двулистная (P. bifolia).

Для проведения анализа химического состава лекарственных растений отбирали зрелые растения. Изучали химический состав целого лекарственного растения. В качестве основных показателей, характеризующих химический состав лекарственных растений, выбрали массовую долю сырого протеина, массовую долю клетчатки, массовую долю жира (сырой жир), массовую долю золы, целлюлозы, а также содержание биологически активных веществ.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что массовая доля протеина во всех растениях варьируется в диапазоне от 6,51 до 14,67 %. Содержание жира в исследуемых образцах лекарственных растениях находится в диапазоне от 0,87 до 2,23 %. Максимальным содержанием клетчатки (19,49 ± 0,58 %) характеризуется любка двулистная, а минимальным (8,53 ± 0,25 %) — жарновец метельчатый (Sarothamnus scoparius).

Изучение химического состава указанных растений показало, что лекарственные растения содержат в своем составе в разных величинах и комбинациях микроэлементы: фосфор, калий, кальций, натрий, магний, серу, а также значительное количество органических кислот (янтарная кислота, бензойная кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, щавелевая кислота, винная кислота). Растения содержат водорастворимые витамины (аскорбиновая кислота, рибофлавин, тиамин).

Анализ химического состава растительных экстрактов также показал наличие важных составляющих, способных обеспечить высокую степень защиты от грибковых и бактериальных инфекций.

Использование в качестве сырья для производства БАВ подверженных анализу лекарственных растительных средств (фитогеников) будет способствовать повышению потребления пищи, стимуляции пищеварения и росту, снижению частоты диареи, повышению эффективности потребления кормов и продуктивности и, в конечном счете, увеличению рентабельности мясного производства.

© О. О. Бабич, В. В. Ларина, С. Ю. Носкова, С. А. Сухих, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках исполнения Гранта Президента (соглашение № 075-15-2021-310 от 19.04.2021 (внутренний номер МД-135.2021.1.4)).

МЕТОД ВЫБОРА ЗНАЧИМЫХ ПРИЗНАКОВ ДЛЯ БИНАРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ДАННЫХ С ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ

И. Ю. Бойко

Алтайский государственный университет, Барнаул

E-mail: jehll@ya.ru

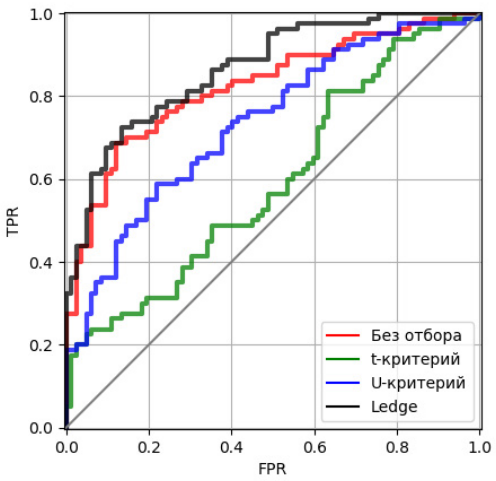
Аннотация

Данным с микрочипов свойственна высокая размерность при сравнительно малом количестве объектов. Применение разработанного метода фильтрации позволило получить более высокое качество классификации при использовании менее 12 % от общего количества признаков.

Современные исследования в области биоинформатики, проводимые с использованием микрочипов, нередко связаны с поиском возможности ранней диагностики онкологических заболеваний. Микрочипы используются для получения информации о состоянии организма человека с целью выполнения бинарной классификации — поиска правила, эффективно разделяющего две группы пациентов. Качественному анализу данных с микрочипов часто препятствуют две основные особенности этой информации: высокая зашумленность и большое количество признаков, которое может доходить до сотен тысяч при сравнительно малом числе объектов. Применение методов отбора признаков позволяет сократить шумовую составляющую данных и уменьшить используемые вычислительные ресурсы. Среди типов отбора признаков наиболее распространено использование алгоритмов фильтрации в силу высокой скорости их работы. Распространенные на практике методы не вполне нацелены на выявление взаимосвязи числового и бинарного признаков, свойственной биомаркерам, поэтому для такой цели был введен ledge-коэффициент корреляции, используя который в качестве меры оценки значимости признаков, мы разработали унивариативный алгоритм фильтрации [1].

В настоящей работе использованы данные с пептидных микрочипов Российско-американского противоракового центра АлтГУ, состоящие из 162 объектов и 330 034 числовых признаков, значения каждого из которых изменяются в диапазоне от 0 до 65535 [2].

Для выбора значимых признаков был применен предложенный нами алгоритм фильтрации на основе ledge-коэффициента, а также распространенные на практике t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна — Уитни. Отбор признаков выполнялся с фиксированным уровнем значимости 0,05 с использованием перекрестной проверки «один против всех» (Leave One Out). На каждой ее итерации происходил выбор значимых признаков на основании указанных выше фильтров. После этого на выбранном множестве пептидов выполнялась настройка модели регрессии на латентные структуры (PLS-R), эффективность применения которой к исследуемым данным была выявлена ранее [2]. Использовалась метрика качества AUC (Area Under ROC Curve). Расчеты выполнены на языке программирования Python 3 с использованием модулей NumPy, Pandas, scikit-learn, Hyperopt. На рисунке представлены основные результаты проведенного эксперимента.



ROC-графики, характеризующие бинарную классификацию данных с пептидных микрочипов при использовании различных методов отбора признаков

Применение разработанного алгоритма фильтрации на основе ledge-коэффициента в сочетании с моделью регрессии на латентные структуры (PLS-R) позволило улучшить качество классификации рассматриваемых данных, достигнутое ранее без использования методов отбора признаков. Произошло увеличение значения AUC с 0,824 до 0,866 при использовании 11,73 % от общего количества признаков.

Литература

1. Бойко И. Ю., Анисимов Д. С., Смолякова Л. Л. и др. Подход к отбору значимых признаков при решении биомедицинских задач бинарной классификации данных с микрочипов // Математическая биология и биоинформатика. 2020. Т. 15. № 1. С. 4–19.

2. Анисимов Д. С., Подлесных С. В., Колосова Е. А. и др. Анализ многомерных данных пептидных микрочипов с использованием метода проекции на латентные структуры // Математическая биология и биоинформатика. 2017. Т. 12. № 2. С. 435–445.

© И. Ю. Бойко, 2021

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЕ ПИТАНИЕ — ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ МЕРОПРИЯТИЕ ПРОТИВ АТЕРОСКЛЕРОЗА*

А. Д. Веснина

Кемеровский государственный университет

E-mail: koledockop1@mail.ru

Аннотация

Общая цель персонализированного питания — улучшение здоровья потребителя за счет точных и эффективных рекомендаций по питанию. Индивидуальные диеты составляются с учетом генетической, фенотипической, клинической, диетической информации о потребителе. В данной работе подобраны персональные рекомендации по питанию для профилактики атеросклероза (одной из причин возникновения ССЗ, связанной с хроническим воспалением, нарушением метаболизма липидов).

Для профилактики ССЗ, в частности атеросклероза, важным профилактическим мероприятием является соблюдение правильного питания. На сегодняшний день (с учетом концепции «4П» в здравоохранении) под правильным питанием ученые подразумевают персонализированное питание, составленное с учетом индивидуальных особенностей потребителя (в частности, нутригенетических особенностей).

В данной работе для составления персональных рекомендаций получены 1) добровольное информированное согласие от участника исследования (добровольца); 2) биоматериал (венозная кровь собиралась квалифицированным медицинским работником), из которого методом фенол-хлороформной экстракции выделена ДНК; с помощью ПЦР-РВ проведен анализ SNP определенных генов; 3) личные данные от потребителя (наличие/отсутствие вредной привычки — курения, рост, вес, показатели артериального давления, предпочтения в видах продукции). Были проанализированы SNP генов, принимающих участие в фолатном цикле — *MTR* (rs 1805087), *MTHFR* (rs1801133), в системе антиоксидантной защиты организма — *CAT* (rs1001179), *MnSOD* (rs4880), *GPx1* (rs1050450), в регуляции липидного обмена — *CETP* (rs5882), *ApoA5* (rs662799), *PPARG* (rs1801282). Для удобства оценки факторов риска развития атеросклероза была введена балльная система (см. таблицу).

В результате исследования установлено, что риск, связанный с курением/пассивным курением и избыточной массой тела у добровольца отсутствовал. Присутствовал риск, связанный с артериальной гипертонией (АГ) — артериальное давление 140–159/90–99 мм. рт. ст., I степень АГ. В результате этого необходимо снижение потребления соли до 5 г в сутки, увеличение потребления калия и магния (рекомендации Российского кардиологического общества). Наблюдался генетический риск в 8 баллов: высокий риск развития окислительного стресса, отсутствие риска нарушений в работе фолатного цикла, высокий риск возникновения атеросклеротической бляшки из-за накопления «плохих» липидов. Следовательно, необходимо обогащение рациона антиоксидантами (в дозах адекватного уровня потребления по МР 2.3.1.1915-04), соблюдение низкожировой диеты: исключение жирных сортов мяса, молочных продуктов и т. п.

Также от потребителя были получены данные о том, что самой востребованной продукцией, употребляемой ежедневно, являлись кисломолочные продукты. В рамках данного исследования разработана примерная рецептура греческого йогурта (на 150 г продукта, употребляемого 1 раз в сутки), обогащенного антиоксидантами (кверцетином — 30 мг, витамином С — 69 мг, витамином В3 — 18 мг) и пищевыми волокнами (инулином — 10 г). Содержание данных биологически активных веществ было подобрано с учетом рекомендаций МР 2.3.1.1915-04. Данные вещества были выбраны еще и с учетом того, что они являются пробиотиками и пребиотиками, дополнительно нормализующими работу микрофлоры ЖКТ, влияющей на развитие ССЗ.

В ходе проведенного исследования проанализированы генетические особенности, связанные с питанием и влияющие на развитие атеросклероза. На основании полученных данных подобраны рекомендации к диете. С учетом индивидуальных предпочтений, связанных с конкретным видом продукта, сформирован состав функционального йогурта, систематическое употребление которого способствует профилактике атеросклероза и ССЗ.

© А. Д. Веснина, 2021

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

Риск развития атеросклероза в соответствии с генотипом

Функция	Ген	Полиморфизм	Генотип		
			norm/norm	**norm/mut**	**norm/mut**
Метаболизм ферментов антиоксидантной системы	***CAT***	rs1001179	CC	CT	TT
	вызывает снижение активности фермента (каталазы)		норма	средняя активность фермента	низкая активность фермента
	MnSOD	rs4880	CC	CT	TT
	связан с пониженной активностью фермента (супероксид-дисмутазы)		норма	средняя активность фермента	низкая активность фермента
	GPx1	rs1050450	CC	CT	TT
	связан с пониженной активностью фермента (глутатионпероксидазы)		норма	средняя активность фермента	низкая активность фермента
Метаболизм гомоцистеина и фолиевой кислоты	***MTR***	rs 1805087	AA	AG	GG
	снижает уровень гомоцистеина в плазме крови		высокий уровень гомоцистеина	средний уровень гомоцистеина	низкий уровень гомоцистеина
	MTHFR	rs1801133	CC	CT	TT
	связан с пониженной активностью фермента, содержание гомоцистеина в плазме крови увеличивается		норма	увеличенное содержание гомоцистеина	высокое содержание гомоцистеина
Метаболизм липидов	***CETP***	rs5882	A/A	A/G	G/G
	связан с повышенной активностью фермента, содержание ЛПВП в крови увеличивается		высокое содержание ЛПНП	средняя активность фермента	увеличение содержания ЛПВП и снижение ЛПНП
	ApoA5	rs662799	T/T	T/C	C/C
	связан с пониженной активностью фермента, с регуляцией уровня триглицеридов		низкое содержание триглицеридов и ЛПОНП	средняя активность фермента	высокое содержание триглицеридов и ЛПОНП
	PPARG	rs1801282	C/C	C/G	G/G
	связан с пониженной активностью фермента, с регуляцией уровня триглицеридов		норма	средняя активность фермента	высокое содержание холестерина

— низкий риск, 0 баллов — средний риск, 1 балл — высокий риск, 2 балла

МЕТОД ФЕРМЕНТАТИВНО-КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА КОСТНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ЖЕЛАТИНА*

Р. А. Ворошилин

Кемеровский государственный университет

E-mail: rom.vr.22@mail.ru

Аннотация

Представлен метод ферментативно-кислотного гидролиза костного сырья для ускорения процесса производства желатина. Исследовано влияние протеолетического фермента совместно с соляной кислотой (HCl 1M) на процесс деминерализации костного сырья. Получены результаты сравнительного выхода желатина при использовании разных схем ферментативно-кислотного гидролиза.

Производство желатина включает в себя сложные многоступенчатые процессы, в которых используется большое количество кислот, щелочи и воды. В классической схеме производства желатина деминерализация, известкование и обеззоливание являются основными подготовительными технологическими этапами перед процессом экстракции желатина. Данные процессы занимают достаточно продолжительное время, например продолжительность деминерализации от 7 до 14 дней, известкования — от 3 до 8 недель, обеззоливания — 1–2 суток, при этом каждый из данных подготовительных технологических этапов подразумевает использование большого количества химических реагентов, таких как HCl и $Ca(OH)_2$. Современное высокоэффективное производство не может позволить в своей технологической линии такие долгосрочные процессы, в связи с чем возникает актуальность в поиске новых технологических решений, которые помогут оптимизировать данный этап производства.

Проведя анализ потенциально выбранных ферментов для проведения экспериментальных исследований, выбрали фермент пепсин фирмы «МЕЙТО», так как по основным характеристикам он оказался потенциально более подходящим для реализации оптимизированной технологии получения желатина.

Для проведения экспериментальной части работы использовали предварительно обезжиренное говяжье костное сырье, измельченное до размеров 3 ± 0,5 мм. Костное сырье подвергалось гидролизу ферментом пепсином «МЕЙТО» микробиального происхождения с ферментной активностью 300 000 ед. Данную комбинацию использовали в связи с тем, что активация используемого фермента происходит при взаимодействии с соляной кислотой (HCl), в этом взаимодействии они обладают высокими протеолитическими свойствами, что способствует разрушению костного матрикса исследуемого сырья. Гидролиз микробиальным ферментом пепсином и соляной кислотой (HCl 1 M) проводили по следующим схемам.

Схема 1 — концентрация фермента 30 ед., соотношение костного сырья к растворителю 1 : 10, время обработки 240 мин.

Схема 2 — концентрация фермента 35 ед., соотношение костного сырья к растворителю 1 : 9, время обработки 240 мин.

Схема 3 — концентрация фермента 40 ед., соотношение костного сырья к растворителю 1 : 9, время обработки 180 мин.

Схема 4 — концентрация фермента 45 ед., соотношение костного сырья к растворителю 1 : 9, время обработки 180 мин.

По схемам, описанным выше, проводили обработку мелкоизмельченного обезжиренного костного сырья. Измельченное сырье помещали в раствор соляной кислоты (HCl 1M), в составе которой был фермент микробиального происхождения пепсин с ферментной активностью от 30 до 45 ед. Гидролиз исходного сырья проводили при температуре 30 ± 2 °С на протяжении от 60 до 240 минут; pH среды находилась в пределах 1,5–2,0 ед. Для равномерной обработки костного сырья раствором в течение всей продолжительности эксперимента использовали магнитные мешалки. После проведения гидролиза костное сырье подвергалось нейтрализации NaOH и промывке водой с дальнейшим центрифугированием, которое способствовало отделению минерального осадка от оссеина. Далее полученный оссеин промывали деминерализованной водой.

После отделения минерального остатка оссеин отправляли на экстракцию желатина. С целью ресурсосбережения и обеспечения экологичности производства проводили водную экстракцию желатина.

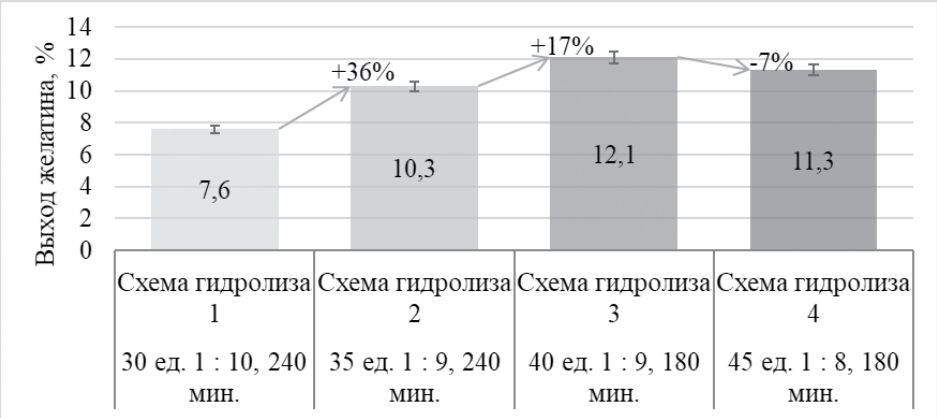
После проведения водной экстракции полученные образцы подвергались фильтрации через марлевые фильтры.

© Р. А. Ворошилин, 2021

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

Для проведения дальнейших исследований проводили стерилизацию отфильтрованных растворов желатина с целью уничтожения патогенных микроорганизмов, так как высокобелковые растворы являются благоприятной средой для их развития. На этом важном этапе использовали стерилизацию паром в автоклаве, данный способ является микробиологически безопасным в высокой степени. На заключительном этапе проводили распылительную сушку полученных желатиновых бульонов.

Таким образом, исходя из результатов сравнительной оценки выхода желатина при проведении гидролиза по разным схемам можно заключить, что самыми эффективными режимами обработки являются обработка костного сырья по схеме 3 (см. рисунок) при соотношении костного сырья к растворителю 1 : 9 и концентрации фермента 40 ед.



Сравнительный выход желатина при использовании разных схем получения

Таким образом, были получены образцы желатиновых бульонов с разным выходом сухого вещества от 7,6 до 12,1 %. Наибольший выход сухого желатина обеспечивает схема гидролиза 3 при параметрах активности фермента 40 ед., соотношении растворителя 1 : 9 и времени гидролиза 180 минут.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, ПРИ ОКИСЛЕНИИ *IN VITRO* ХЛОРОФИЛЛА *A* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ ФЕНТОНА*

Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик

Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск

E-mail: yauhen.viazau@gmail.com

Аннотация

Изучено влияние астаксантина на разрушение хлорофилла *a* под действием продуктов реакции Фентона. Показано защитное действие астаксантина в такой системе как в форме эфиров, так и в свободной форме. Предположительно, оно обусловлено нейтрализацией генерирующегося в таких условиях гидроксильного радикала. Установлено, что при высокой концентрации астаксантина его защитное действие выраженнее для жирнокислотных эфиров пигмента.

Астаксантин является одним из сильнейших антиоксидантов и играет защитную роль в клетках водоросли *Haematococcus pluvialis*. В данной работе изучено антиоксидантное действие пигмента в модельной системе, частично воспроизводящей процесс окисления хлорофилла фотосинтетического аппарата в живой клетке водоросли.

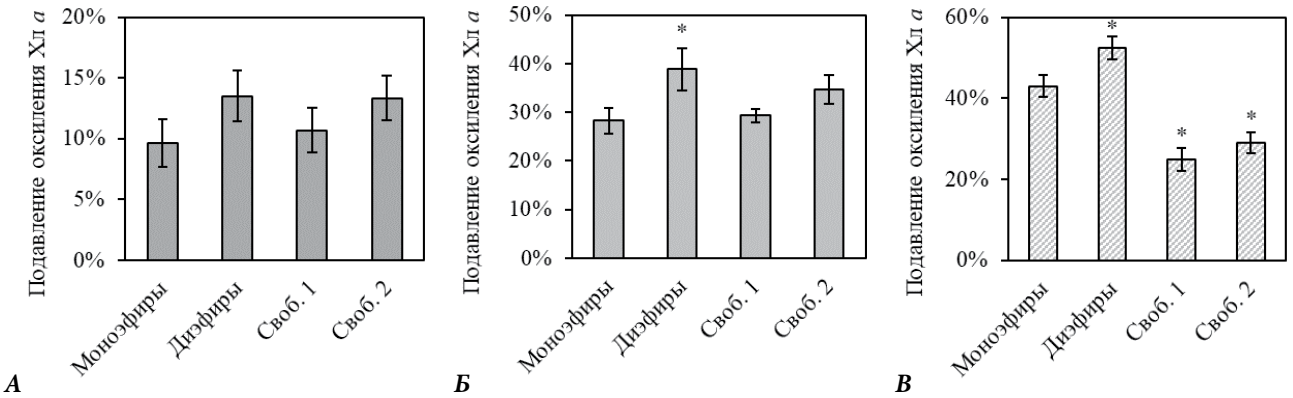
Растворы моно- и диэфиров астаксантина (в ацетоне и смеси гептан : бутанол) готовили из предварительно высушенных фракций, полученных после колоночной хроматографии гексанового экстракта из клеток *H. pluvialis*. Для приготовления растворов свободного астаксантина в тех же растворителях использовали коммерческий препарат (Sigma-Aldrich, США).

В пробирку вносили 500 мкл экстракта хлорофилла *a* из клеток *Spirulina platensis*, 500 мкл раствора астаксантина, 10 мкл 50 мМ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 мкл 50 мМ H_2O_2. Смесь тщательно перемешивали и оставляли в темноте при 23–24 °С на 16 ч. В положительном контроле в смесь вместо астаксантина, сульфата железа и пероксида водорода вносили соответствующий объем растворителя. В отрицательном контроле вместо астаксантина вносили соответствующий объем растворителя. Затем проводили жидкостную хроматографию высокого давления. Антиоксидантное действие астаксантина рассчитывали в процентах уменьшения доли разрушенного хлорофилла *a* по сравнению с отрицательным контролем (вариант без добавления астаксантина).

Результаты опытов в 100%-м ацетоне приведены на рисунке.

Помимо этого, в смеси гептан : бутанол (82 : 18) были получены близкие значения подавления окисления хлорофилла по сравнению с ацетоном при концентрации астаксантина 6,7 мкМ. Так, в указанной среде для эфиров подавление окисления хлорофилла *a* составило в среднем 15,0 %, а для свободного пигмента — 13,6 %.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что астаксантин оказывает подавляющее действие на окисление хлорофилла *a* в ходе реакции Фентона под действием накапливающихся активных форм кислоро-



Влияние различных форм астаксантина на окисление хлорофилла *a* продуктами реакции Фентона в ацетоне: *А* — 6,7 мкМ астаксантина; *Б* — 16,8 мкМ; *В* — 33,5 мкМ; *Своб. 1* — свободный транс-астаксантин; *Своб. 2* — смесь свободных транс- и цис-астаксантинов; *Хл a* — хлорофилл *a*; * — достоверные отличия от варианта «Моноэфиры» ($p \leq 0{,}05$)

© Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик, 2021

*Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19РМ-010).

да. Вероятно, окисление хлорофилла в данном случае обусловлено, в первую очередь, действием гидроксильного радикала ·OH. В то же время видно, что диэфиры астаксантина оказываются эффективнее моноэфиров, а наличие небольшой доли цис-изоформ в составе раствора свободного астаксантина также повышает его эффективность по сравнению с чистым транс-астаксантином. При высокой концентрации эфиры астаксантина проявляют в данной системе существенно более высокую антиоксидантную активность, чем его свободная форма. Замена полярного растворителя (ацетон) на слабополярный (смесь гептан : бутанол) в среднем не вызывает существенных изменений в величине антиоксидантного эффекта астаксантина при окислении хлорофилла *a* продуктами реакции Фентона.

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ МОРЕЙ АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА ПРИ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ*

Л. А. Гавирова [1,2], П. А. Щербакова [1,2], И. Н. Сережкин [3], О. О. Шестакова [1,2], А. И. Исаченко [3], А. И. Шестаков [1,2]

[1] Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
[2] Фонд поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие», Москва
[3] Арктический научный центр, Москва

E-mail: polia.scherbackova@yandex.ru

Аннотация

Показана способность сообществ микроорганизмов, полученных из образцов воды и грунта побережья морей арктического региона, к деструкции углеводородов при отрицательных температурах при наличии и отсутствии льда. Значения суммарной убыли нефтепродуктов при культивировании в течение 90 суток при –2,5 °С достигали при наличии льда 42 %, а при отсутствии льда — 62 % соответственно.

В арктическом регионе России сосредоточены большие запасы углеводородов, которые в последнее время становятся все более доступными для активной разведки и нефтедобычи. В данных условиях крайне важной становятся разработка и совершенствование технологий утилизации возможных разливов нефти как на суше, так и на морской акватории. В настоящее время на рынке представлен довольно широкий спектр препаратов для утилизации разливов на основе микроорганизмов, потребляющих углеводороды. Для большинства подобных препаратов заявлен относительно широкий диапазон рабочих условий и температур. Однако большинство входящих в состав таких препаратов микроорганизмов являются мезофильными, не приспособленными к росту и развитию в условиях низких температур, а потому малоэффективными в условиях Арктики. Целесообразным видится использование для биоремедиации микроорганизмов, способных к утилизации углеводородов при низких, в том числе отрицательных температурах, выделенных из морей данного региона в участках хронических загрязнений.

Целью работы является оценка способности полученных устойчивых сообществ микроорганизмов к утилизации углеводородов при низких температурах при наличии и отсутствии льда. Для исследования были выбраны стабильно пересеваемые сообщества, полученные из образцов морской воды, грунта, растительной биомассы, отобранные в местах хронических углеводородных загрязнений побережья Белого (Кан2), Баренцева (М1Н1), Карского морей (НЗ 4, НЗ 12). В работе использовали модифицированную среду Таусона, г/л: K_2HPO_4 — 1,5; KH_2PO_4 — 0,75; $MgSO_4*7H_2O$ —1,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 4,0; NaCl — 30; гидролизат казеина — 0,5; дрожжевой экстракт — 0,1; pH 7,0. В качестве источника углеводородов вносили 1 % (по объему) смеси товарной нефти и дизельного топлива в соотношении 1 : 1 по объему. Такое же количество смеси вносили в контрольный образец — стрерильную морскую воду. Культивирование проводили в течение 90 суток при температуре –2,5 °С, при внесении и отсутствии льда. Степень деструкции углеводородов определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на приборе Кристалл 2000м (Хроматэк) с капиллярной колонкой DB-1 (Agilent) с пламенно-ионизационным детектором.

Для всех исследуемых сообществ была показана значительная убыль углеводородов при культивировании как при наличии, так и при отсутствии льда. Значения суммарной убыли нефтепродуктов составили для М1Н1, Кан2, НЗ 4, НЗ 12 при наличии льда 30, 23, 13, 42 %, а при отсутствии льда — 32, 59, 25, 62 % соответственно. При этом убыль алканов в каждом варианте была выше, чем нафтено-ароматических компонентов, и достигала 92 % для НЗ 12, при 52 % нафтено-ароматики.

Количественный анализ утилизации различных фракций показывает высокую эффективность микробной деструкции углеводородов. Полученные сообщества и в дальнейшем чистые культуры, выделенные из них, являются крайне перспективными для дальнейших биотехнологических разработок для биоремедиации углеводородных загрязнений арктического региона.

© Л. А. Гавирова, П. А. Щербакова, И. Н. Сережкин, О. О. Шестакова, А. И. Исаченко, А. И. Шестаков, 2021

* Исследования выполнены по заказу ПАО «НК “Роснефть”».

БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ ТВЕРДОФАЗНЫХ ГРУНТОВЫХ МТЭ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ЭЛЕКТРОДОВ

О. А. Гасюк, Н. Н. Волченко, А. А. Лазукин, А. А. Самков, А. А. Худокормов

Кубанский государственный университет, Краснодар

E-mail: lelya.gasyuk@mail.ru

Аннотация

Микробные топливные элементы являются новыми перспективными экологически чистыми источниками энергии. С помощью этих биотехнологических устройств возможно получить возобновляемую электроэнергию в результате биоэлектрохимической активности некоторых видов микроорганизмов. Данные биоинженерные системы в дальнейшем могут найти практическое применение в мониторинге окружающей среды, биоремедиации, как биосенсоры в медицине и др.

На сегодняшний день постоянно растущие потребности населения Земли в электроэнергии и истощение ископаемых ресурсов вынуждают искать альтернативные и экологически чистые источники энергии — в том числе маломощные для «умных сетей» распределенной энергетики, «интернета вещей» и др. Поэтому в настоящее время изучаются способы получения биоэнергии при помощи некоторых видов микроорганизмов, обладающих электрогенными свойствами. Для этого активно разрабатываются системы микробных топливных элементов (МТЭ).

Целью данной работы является сравнение количества электроэнергии, полученной при помощи МТЭ, с различными типами электродов.

В исследовании использовались безмембранные твердофазные МТЭ с горизонтальными и вертикальными электродами. В качестве наполнителя применялся речной донный песок (2 образца). Электроды были изготовлены из углеродного войлока «Карбопон» и графитовых стержней. В качестве микроорганизма, обладающего электрогенными свойствами, использовался штамм *Shewanella oneidensis* MR-1, полученный из ВКПМ (№ B-9861). Инокулированию бактериями подвергалась половина электродов, вторая половина использовалась в качестве контроля. Биоэлектрогенез фиксировался при помощи автоматического вольтметра авторской конструкции.

В начале эксперимента для активации процессов метаболизма микроорганизмов использовалась жидкая минеральная среда с сахарозой в качестве источника углерода, далее она была заменена на воду. На 4-е сутки эксперимента значение напряжения для вертикальных электродов (контроль) составило 410 и 585 мВ, со штаммом *S. oneidensis* MR-1 — 424 и 589 мВ, для горизонтальных электродов (контроль) — 640 и 668 мВ, со штаммом — 610 и 571 мВ (рис. 1). По полученным данным нельзя было однозначно сказать, какая из ситем МТЭ более эффективна для дальнейшего применения.

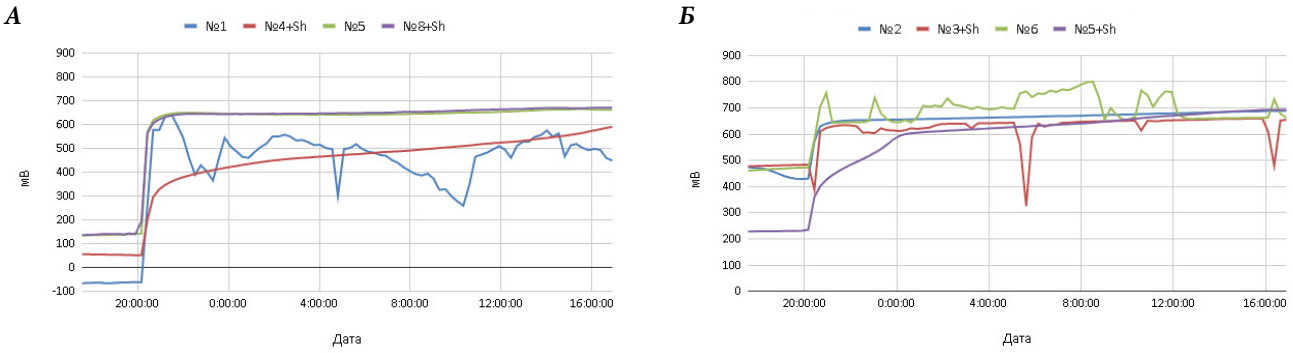


Рис. 1. Биоэлектрогенез МТЭ, электроды № 1, 2, 5, 6 — контрольные, № 3, 4, 7, 8 — инокулированные *S. oneidensis* MR-1. *А* — вертикальные электроды; *Б* — горизонтальные электроды

Далее к системам были подключены резисторы с сопротивлением 1 кОм. В итоге среднее напряжение в течение последующих суток для вертикальных электродов (контроль) составило 32 и 90 мВ, с *S. oneidensis* MR-1 — 68 и 118 мВ. Для горизонтальных электродов (контроль) — 306 и 451 мВ и с *S. oneidensis* MR-1 — 457 и 300 мВ (рис. 2).

© О. А. Гасюк, Н. Н. Волченко, А. А. Лазукин, А. А. Самков, А. А. Худокормов, 2021

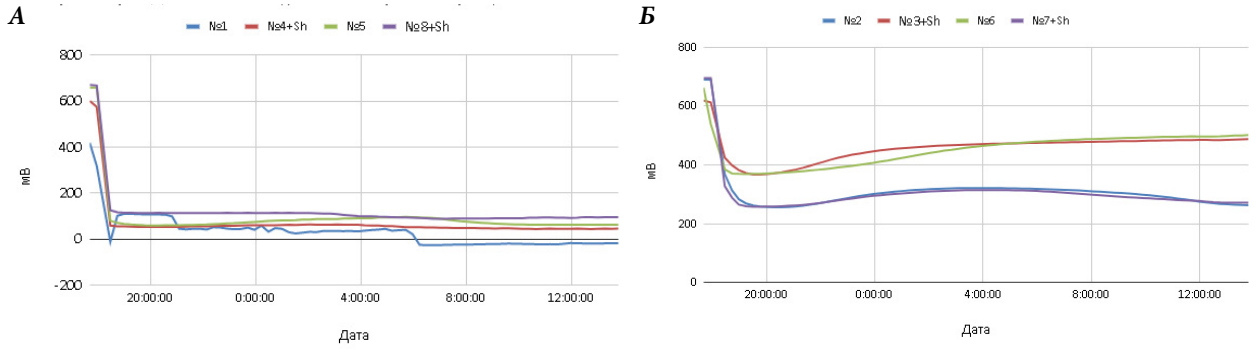


Рис. 2. Биоэлектрогенез МТЭ после установки резисторов, электроды № 1, 2, 5, 6 — контрольные, № 3, 4, 7, 8 — инокулированные *S. oneidensis* MR-1. *А* — вертикальные электроды; *Б* — горизонтальные электроды

После 5 суток эксперимента средний вольтаж МТЭ с вертикальными электродами (контроль) составил 59 и 69 мВ и с *S. oneidensis* MR-1 — 41 и 61 мВ, с горизонтальными электродами (контроль) — 296 и 347 мВ и с экспериментальным штаммом — 416 и 184 мВ. Полученные данные свидетельствуют о том, что электроды горизонтального типа позволяют получить больше электроэнергии по сравнению с вертикальными электродами. Также, сравнивая значения напряжения в системах контроля и системах с *S. oneidensis* MR-1, можно предположить, что в первых формировалось естественное анодофильное сообщество, обладающие способностью к биоэлектрогенезу, в том числе более активному, чем в случае внесения монокультуры лабораторного штамма.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

А. А. Гуцалова

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: gutsalova@scamt-itmo.ru

Аннотация

В настоящее время развитие методов получения различных наноматериалов позволяет регулировать свойства наночастиц, представляющие интерес для медицины и биотехнологии, и управлять ими. Объектом исследования стали мезопористые наночастицы диоксида кремния.

В последние несколько лет мезопористые наночастицы диоксида кремния широко исследовались в качестве нового материала для применения в области биомедицины. Основными преимуществами наночастиц диоксида кремния являются высокая биосовместимость, невысокая стоимость, низкая токсичность. Благодаря своей высокой удельной площади поверхности, способности к химической модификации и большому объему пор мезопористые наночастицы диоксида кремния представляют интерес в качестве систем доставки биологически активных веществ [1]. Однако биосовместимость кремнезема зависит от нескольких факторов, таких как размер частиц, форма и химический состав поверхности. Размеры частиц могут влиять на биологические параметры кремнезема, включая распределение, продолжительность циркуляции и скорость выведения. Наночастицы кремнезема меньшего размера имеют более длительный срок службы для кровообращения [2]. Большая площадь поверхности наночастиц мезопористого диоксида кремния позволяет переносить большее количество желаемого лекарственного средства по сравнению с традиционными методами, включающими полимеры, липосомы и везикулы. Методом темплатного синтеза нами были получены мезопористые наночастицы диоксида кремния [3]. Исследование морфологии на сканирующем электронном микроскопе FEI Quanta 200 приводит к заключению, что полученные образцы представлены сферическими наночастицами диаметром около 50 нм. Удельная площадь поверхности, объем и размер пор определялись количественно по методу низкотемпературной адсорбции азота. Удельная площадь поверхности рассчитывалась с использованием уравнений Брунауэра — Эммета — Теллера и составила 977 $м^2$/г. Объем пор, рассчитанный по уравнению Барретта — Джойнера — Халенды соответствует 1,0 $см^3$/г, а средний размер пор составляет 3 нм. Результаты данных динамического светорассеяния коллоида из наночастиц подтверждают выводы о размерах и узком распределении.

Литература

1. Hudson S. P., Padera R. F., Langer R. et al. The biocompatibility of mesoporous silicates // Biomaterials. 2008. Vol. 29. P. 4045–4055.

2. Huang X., Li L., Liu T. et al. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility *in vivo* // ACS Nano. 2011. Vol. 5. P. 5390–5399.

3. Qiao Z.-A., Zhang L., Guo M. et al. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles via Controlled Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxide // Chem Mater. 2009. Vol. 21. P. 3823–3829.

© А. А. Гуцалова, 2021

ЛИПОФИЛЬНЫЕ ПРОЛЕКАРСТВА НА ОСНОВЕ 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-ТИАЦИТИДИНА

Е. С. Дарнотук, Е. О. Моренко, К. Д. Войтик, А. Б. Пшеничникова, Н. С. Шастина

МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва

E-mail: Mslizirichi@yandex.ru

Аннотация

В ходе исследования различных модификаций уже существующих ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ были синтезированы новые липофильные пролекарства 2`,3`-дидезокси-3`-тиацитидина (3TC) на основе 1,3-дипальмитоилглицерина, модифицированные по фосфорному центру рядом эфиров L-аланина.

Как только вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) был идентифицирован как этиологический агент синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), обратная транскриптаза (ОТ) ВИЧ стала одной из основных мишеней для разработки противовирусных препаратов. Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) активируются внутриклеточно до их трифосфатных форм, которые конкурируют с эндогенными дезоксинуклеозидтрифосфатами в качестве субстрата для ОТ ВИЧ и прекращают синтез цепи ДНК-полимеразы ВИЧ-1. Эффективность применяющихся НИОТ значительно снижена из-за возникновения перекрестной резистентности, побочных эффектов и плохой переносимости у пациентов. Поэтому изучение новых модификаций антиВИЧ-препаратов по-прежнему является важной задачей для медицинской химии, направленной на создание соединений с улучшенной эффективностью, селективностью и фармакокинетическими свойствами, сниженными побочными эффектами и новыми терапевтическими мишенями [1].

Липидный пролекарственный подход с использованием 1,3-диацилглицеринов способствует тому, что нуклеозидный препарат будет включаться в пути метаболизма липидов и тем самым направленно достигать лимфатической системы. Получение пролекарственных соединений, в составе которых уже имеется фосфорный центр, в свою очередь, позволит обойти лимитирующую стадию внутриклеточного фосфорилирования нуклеозидов.

На основании предыдущих работ [2, 3] были получены новые глицеролипидные производные 2`,3`-дидезокси-3`-тиацитидина (3TC), связывание молекулярных фрагментов осуществлялось с помощью функциональных фосфорных связей. Для повышения стабильности полученных конъюгатов 2`,3`-дидезокси-3`-тиацитидина к действию гидролиза в различных биологических средах, а также модулирования ингибирующей активности таких соединений осуществляли разработку их амидофосфатных производных с эфирами L-аланина.

Для осуществления эффективной доставки синтезированные производные 3TC должны проявлять устойчивость к химическому гидролизу и быть чувствительными к специфическому гидролизу панкреатической липазы. Исследование кинетики гидролиза синтезированных конъюгатов показало, что время половинного гидролиза данных веществ более 20 ч, а время половинного ферментативного гидролиза составило 0,5 мин.

Дальнейшее исследование полученных липофильных пролекарств в модельных клеточных системах позволит определить их ингибирующие свойства в отношении ВИЧ. Таким образом, синтезированные конъюгаты делают возможным расширение многообразия антиретровирусных препаратов, входящих в современные схемы лечения.

Литература

1. Gu S. X., Zhu Y. Y., Wang C. et al. Recent discoveries in HIV-1 reverse transcriptase inhibitors // Curr. Opin. Pharmacol. 2020. Vol. 54. P. 166–172.

2. Shastina N. S., Maltseva T. Yu., D'yakova L. N. et al. Synthesis, properties, and anti-HIV activity of new lipophilic 3'-azido-3'-deoxythymidine conjugates containing functional phosphoric linkages // Russ. J. Bioorg. Chem. 2013. Vol. 39. № 2. P. 161–169 (in Russ.)

3. Darnotuk E. S., Siniavin A. E., Shulga N. V. et al. Phosphoramidate conjugates of 3'-azido-3'-deoxythymidine glycerolipid derivatives and amino acid esters: synthesis and anti-HIV activity // Med.Chem.Res. 2021. Vol. 30. P. 664–671.

© Е. С. Дарнотук, Е. О. Моренко, К. Д. Войтик, А. Б. Пшеничникова, Н. С. Шастина, 2021

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ ИЗ *AMELANCHIER OVALIS* И *HIPPOPHAE RHAMNOIDES*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СИБИРИ, НА ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ПРОТИВОРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ*

М. Ю. Дроздова, Л. С. Дышлюк

Кемеровский государственный университет

E-mail: drozdowa.margarita.00@yandex.ru

Аннотация

В настоящее время снижение окислительного стресса в организме является востребованным. Интерес представляют фенольные кислоты, которые проявляют антиоксидантные свойства. В данной работе представлены наилучшие параметры для получения экстрактов из ирги овальнолистной и облепихи крушиновидной с повышенным содержанием фенольных кислот. Изучена антирадикальная активность экстрактов.

Активные формы кислорода (АФК) играют ключевую роль в продолжительности жизни различных организмов. Радикалы могут изменять биологические макромолекулы. В 1950-х годах была выдвинута теория, согласно которой эндогенные радикалы способны вызывать повреждения в организмах, что приводит к старению, различным мутациям и заболеваниям, например раку. С возрастом эффективность антиоксидантной защиты живых организмов снижается, что приводит к окислительному стрессу.

Задача снижения окислительного стресса является востребованной, поэтому актуально получение природных антиоксидантов из растительных источников. Интерес представляют фенольные кислоты, которые обладают более высокой антирадикальной активностью по сравнению с витаминами-антиоксидантами. Перспективными источниками биологически активных веществ (фенольных кислот) являются лекарственные растения Сибирского федерального округа (СФО).

Цель исследования — получение экстрактов растений ирги овальнолистной (*Amelanchier ovalis*) и облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides*) с повышенным содержанием фенольных кислот и изучение их антирадикальной активности против радикала ABTS.

Для получения экстрактов 4 г высушенного и измельченного растительного сырья помещали в колбу на 100 мл. Экстрагирование осуществляли в шейкер-инкубаторе с перемешиванием и нагреванием. Для извлечения фенольных кислот использовали этиловый спирт в различных концентрациях (30, 50, 70 %). Температуру варьировали от 40 до 80 °С.

Сумму кислот в экстракте и антирадикальную активность определяли спектрофотометрическим методом [1, 2].

Исследования показали, что полученный экстракт из ирги имеет больший выход фенольных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту (2,21 %), чем экстракт из облепихи (1,17 %). При этом экстракт облепихи имел более высокий процент содержания кислоты при использовании 30%-го этанола в качестве экстрагента и нагревании до 80 °С. Наилучшим экстрагентом для извлечения фенолкислот из ирги оказался 50%-й этиловый спирт при нагревании смеси не выше 60 °С. Оптимальная продолжительность извлечения биологически активных веществ из двух растений составила 4 ч. При большей продолжительности процесса (6 ч) происходит уменьшение процента экстрагирования фенольных кислот, что может объясняться переходом балластных веществ в экстракт. Изучение антирадикальной активности полученных извлечений показало их высокую активность против радикала ABTS. Ингибирование данного радикала экстрактом ирги и облепихи происходило на 87,45 и 92,84 % соответственно, что указывает на высокую антирадикальную активность данных экстрактов.

Литература

1. Никитина В. Ф. Определение количественного содержания оксикоричных кислот в стебле золотарника канадского // Современные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации. 2020. С. 24–26.

2. Petron M. J., Andres A. I., Esteban G. et al. Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products // Journal of Cereal Science. 2021. Vol. 98. P. 103162.

© М. Ю. Дроздова, Л. С. Дышлюк, 2021

* Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект FZSR-2020-0006 «Скрининг биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих геропротекторными свойствами, и разработка технологии получения нутрицевтиков, замедляющих старение»).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК *CHO*-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА В СООТВЕТСТВИИ С КОНЦЕПЦИЕЙ QUALITY BY DESIGN

З. В. Захаров, А. Н. Морозов, И. Р. Яхин

МБЦ «Генериум», пос. Вольгинский

E-mail: zakharov@ibcgenerium.ru

Аннотация

Особую роль в достижении высокого качества биофармацевтических препаратов играет внедрение в практику рекомендаций Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека (ICH), в том числе положений руководства ICH Q8 «Фармацевтическая разработка», описывающего принципы эффективной, системной, риск-ориентированной концепции Quality by design. В работе реализованы базовые элементы этой концепции, благодаря которым выявлены потенциальные критические параметры процесса этапа культивирования клеток CHO-продуцентов моноклонального антитела.

Неотъемлемым элементом фармацевтической разработки в рамках концепции «Качество при разработке» (Quality by Design, QbD) является оценка рисков — этап, который позволяет определить потенциальное влияние свойств материалов и параметров процесса на критические показатели качества лекарственного препарата (critical quality attribute, CQA) и ключевые показатели процесса (KPA). В данной работе обоснован выбор и показано практическое применение таких методологических инструментов, как диаграмма Исикавы и «анализ причин и последствий отказов» (Failure mode and effect analysis, FMEA), для идентификации потенциальных критических параметров процесса (potential critical process parameters, pCPP) на стадии культивирования клеток *CHO*-продуцента гуманизированного моноклонального антитела к C5-компоненту комплемента человека. На первоначальном этапе оценки рисков, основываясь на литературных данных и результатах собственных исследований, собраны и систематизированы все возможные факторы, которые могут повлиять на качество продукта и эффективность производственного процесса культивирования, начиная с расконсервации клеток до осветления культуральной жидкости. С помощью диаграммы Исикавы оценены взаимосвязи этих факторов. В рамках FMEA-анализа для каждого параметра процесса определено «значение приоритетности риска» (risk priority number, RPN). Значение RPN позволяет ранжировать потенциальные отказы по значимости и рассчитывается в виде произведения оценок трех составляющих: 1 — степени воздействия отклонения на CQA финального продукта и KPA (severity), 2 — потенциального отклонения за рабочие диапазоны (occurrence), 3 — рейтинга обнаружения отклонения параметра (detectability).

В итоге в качестве pCPP определены семь параметров: посевная плотность клеток, pH, DO, время начала внесения подпиток, скорость внесения подпитки/количество, продолжительность культивирования и температура. Полученные результаты являются входными данными для дальнейшего этапа по характеристике процесса в рамках проектного поля в соответствии с принципами QbD.

© З. В. Захаров, А. Н. Морозов, И. Р. Яхин, 2021

СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ ГЛУТАТИОНА С А-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ *

А. М. Иншакова [1], В. А. Щелконогов [1,2], Н. С. Шастина [1],
О. А. Баранова [2], А. В. Чеканов [2], Э. Ю. Соловьёва [2], А. И. Федин [2]

[1] МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

E-mail: aminshakova@yandex.ru

Аннотация

Был осуществлен синтез производных на основе глутатиона и α-липоевой кислоты (α-ЛК) для повышения метаболической устойчивости, антиоксидантного и терапевтического действия, защиты от биодеградации и пролонгированного высвобождения субстанций из полученных соединений. Были получены конъюгаты двух типов: через сложноэфирные связи с использованием 1,3-пропандиола в качестве спейсера, а также путем образования амидной связи между компонентами.

В настоящее время активно изучаются патофизиологические механизмы цереброваскулярных заболеваний и идентифицируются потенциальные природные или синтетические соединения, которые эффективно применяются при профилактике и/или лечении данных патологий. Одними из перспективных агентов являются α-липоевая кислота (α-ЛК, тиоктовая кислота, 5-(1,2-дитиолан-3-ил)пентановая) и глутатион. α-ЛК выполняет такие важные функции, как регенерация экзогенных и эндогенных антиоксидантов, репарация окисленных белков, регуляция факторов транскрипции, а также считается универсальным антиоксидантом, защищает клетки и жирные кислоты от оксидативного повреждения, предотвращает перекисное окисление липидов и образование активных форм кислорода, защищает от разрушающего действия ультрафиолета. Однако активность молекулы α-ЛК ограничена такими критическими факторами, как низкая растворимость, быстрое связывание с белками и биодеградация под действием разных ферментов при попадании в организм [1, 2]. Другим антиоксидантом является глутатион — вследствие его высокого восстановительного потенциала. Меркаптогруппа глутатиона (SH) используется как донор электрона в реакциях нейтрализации токсичных окисленных субстратов в организме. Система глутатиона, связывает свободные радикалы, восстанавливает продукты перекисного окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот и выводит их из организма в виде нетоксичных соединений. Было показано, что нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза, связанное со снижением концентрации глутатиона в клетках, приводит к воспалительным процессам, что стимулирует разработку новых лекарственных препаратов на основе глутатиона и его производных [3].

Вследствие этого **целью данной работы** является создание конъюгатов α-ЛК с глутатионом с высокой эффективностью действия.

Синтез производных на основе глутатиона и α-липоевой кислоты осуществлялся двумя путями. Первый вариант синтеза заключался в получении конъюгата α-ЛК с глутатионом первоначальной этерификацией по Стеглиху спейсерной молекулы и α-ЛК при каталитическом действии 4-диметиламинопиридина и 1,3-дициклогексилкарбодиимида с последующим взаимодействием образовавшего продукта монозамещения с защищенным глутатионом в аналогичных условиях. Другой путь синтеза заключался в образовании амидного конъюгата α-ЛК и глутатиона при использовании N-гидроксисукцинимидного эфира α-ЛК.

Целевые соединения очищали методом колоночной и флэш-хроматографии. Структуры всех синтезированных соединений были подтверждены методом ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Дальнейшее удаление защитных групп полученных конъюгатов и разработка нанодисперсий на их основе может привести к получению препаратов с высоким антиоксидантным действием.

Литература

1. Pop A. L., Cris S. Evaluation of dissolution profiles of a newly developed solid oral immediate-release formula containing alpha-lipoic acid // Processes. 2021. Vol. 9. P. 176–198.

2. Benchekroun M., Pachón-Angona I. Synthesis, antioxidant and Aβ anti-aggregation properties of new ferulic, caffeic and lipoic acid derivatives obtained by the Ugi four-component reaction // Bioorganic Chemistry. 2019. Vol. 85. P. 221–228.

3. Gaucher C., Boudier A. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies // Antioxidants. 2018. Vol. 7. P. 61–82.

© А. М. Иншакова, В. А. Щелконогов, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, Э. Ю. Соловьёва, А. И. Федин, 2021

* Исследования выполнены в рамках государственного задания (№ гос. регистрации АААА-В20-220091790054-9).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АМФИПАТИЧЕСКИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ*

М. И. Камалов, В. А. Николаева, А. М. Павлюк, Т. И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: kamalovmi@gmail.com

Аннотация

Синтезированы амфипатические анионные пептиды на основе аспарагиновой кислоты. Охарактеризованы их амфифильные свойства, взаимодействие с липосомами и цисплатином.

Пептидные амфифилы (ПА), модифицированные липофильными группами, рассматриваются в качестве перспективных биоматериалов и переносчиков лекарств благодаря биосовместимости, регулируемым физико-химическим, супрамолекулярным и таргетным свойствам. Перспективными ПА являются полианионные амфипатические системы, обладающие мембраномодулирующей активностью и образующие комплексы с катионными лекарственными молекулами.

В работе методом твердофазного синтеза по Fmoc-технологии синтезированы конъюгат олигопептида L-аспарагиновой кислоты с лауриновой кислотой (**1**), а также его вариант с таргетной последовательностью RGD (**2**). Структуру синтезированных пептидов верифицировали методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

Определены критические концентрации мицеллобразования (ККМ) **1** и **2**, составившие 0,70 и 1,24 мМ, соответственно. Мембраномодулирующую активность пептидов характеризовали с использованием модельных липосом различного состава, получаемых методом гидратации тонких липидных пленок. Взаимодействие пептидов с липосомами исследовали методом динамического светорассеяния (ДСР) по изменению гидродинамического диаметра и дзета-потенциала. По данным ДРС амфипатические анионные пептиды ассоциируют с мембраной липосом.

Исследовано комплексообразование пептидов с противоопухолевым препаратом цисплатином. В присутствии цисплатина в концентрациях около эквимолярных наблюдалось уменьшение ККМ пептидов вследствие электростатического взаимодействия катионного лекарства с анионным компонентом. Оценено влияние пептидов на цитотоксичность цисплатина и внутриклеточное проникновение липосом. Результаты представляют интерес в создании новых лекарственных формуляций.

© М. И. Камалов, В. А. Николаева, А. М. Павлюк, Т. И. Абдуллин, 2021

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №20-14-00166) и в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА МЕТОДОМ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ОДНОКАНАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ*

Н. О. Кузнецова, Д. Г. Гогниева, П. Ш. Чомахидзе, Ф. Ю. Копылов

Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России

E-mail: tusia.13@bk.ru

Введение

Распространенность хронической сердечнойнедостаточностьи (ХСН) в Российской Федерации составляет 7 %. Специфичность жалоб низкая — 48–55 %. Для скрининга малосимптомной ХСН требуется дорогостоящая лабораторная диагностика и проведение эхокардиографического исследования (ЭхоКГ). Поиск скрининговых методов выяыления ХСН остается актуальной задачей.

Цель

Создать алгоритм машинного обучения для определения фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) ниже 55 % и диастолической дисфункции левого желудочка (ДД ЛЖ) на основе анализа одноканальной электрокардиограммы (ЭКГ).

Методы

В исследование проспективно было включено 400 пациентов старше 18 лет. Каждому участнику было проведено эхокардиографическое исследование сердца с определением систолической и диастолической функций левого желудочка, регистрация ЭКГ с помощью одноканального портативного монитора в I стандартном отведении в течение 3-х минут. Выполнен спектральный анализ ЭКГ. Построены математические модели «Логистическая регрессия Лассо» и «Случайный лес».

Результаты

С помощью логистической регрессии Лассо ФВ ЛЖ ниже 55 % определялась с чувствительностью 68,2 % и специфичностью 93,5 %, наличие ДД ЛЖ любой степени — с чувствительностью 90 %, специфичностью 80,6 %.

Математическая модель «Случайный лес» предсказывала наличие ФВ ЛЖ ниже 55 % с чувствительностью 86,4 % и специфичностью 90,3 %; ДД ЛЖ — с чувствительностью 80 % и специфичностью 89,3 %.

Заключение

Созданы математические модели «Логистическая регрессия Лассо» и «Случайный лес» для определения ФВ ЛЖ ниже 55 % и обнаружения ДД ЛЖ на основе анализа одноканальной ЭКГ. Полученные модели можно использовать для проведения скрининга.

© Н. О. Кузнецова, Д. Г. Гогниева, П. Ш. Чомахидзе, Ф. Ю. Копылов, 2021

* Работа финансировалась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075-15-2020-926.

ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КСЕНОБИОТИКОВ *

Я. В. Лобанова

Пермский политехнический университет

E-mail: lobanich97@yandex.ru

Аннотация

Для лучшего понимания возможного влияния поллютантов на метаболизм лекарственных средств были проведены пробные эксперименты по оценке метаболической стабильности модельного препарата верапамила с использованием таких подходов, как индукция ферментативной системы и прямое взаимодействие ферментов с поллютантом в инкубационной пробе.

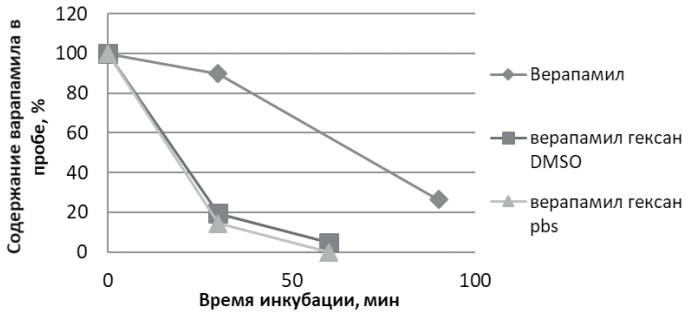
Индивидуальная вариабельность метаболизма лекарственных препаратов — важная и сложно прогнозируемая характеристика, которая определяет эффективность персонализированного подхода в медицине. Кроме собственно генетического полиморфизма, факторами, влияющими на метаболизм ксенобиотика, являются характеристики окружающей среды, в том числе присутствие поллютантов и их воздействие на метаболизм ксенобиотиков. Оценка постоянного нелетального воздействия ксенобиотика на метаболические процессы позволяет понять более полную картину влияния чужеродных веществ на живой организм.

Оценка метаболической стабильности ксенобиотиков *in vitro* — важный этап в исследовании как лекарственных препаратов, так и поллютантов. В качестве биологического материала в работе использовались фракции S9 печени лабораторной крысы. Такая *in vitro* тест-система, моделируя метаболическую трансформацию, позволяет получать данные о свойствах ксенобиотиков, а включение дополнительных факторов может показать более точные результаты влияния поллютантов на биотрансформацию исследуемых веществ [1].

В качестве модельного ксенобиотика использовали субстанцию лекарственного препарата верапамила, так как в его биотрансформацию вовлечены несколько хорошо изученных цитохромов — CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1 [2]. В ходе исследования произведена оценка таких факторов, как индукция ферментов и влияние поллютанта на метаболическую стабильность препарата.

При изучении метаболической стабильности верапамила под действием ферментативной системы, подвергшейся действию ксенобиотика, для получения фракции S9 использовали печень животных, которым вводили рифампицин — индуктор ферментов комплекса P450, в частности CYP3A4 и CYP2E1. Анализ методом УВЭЖХ показал, что скорость трансформации верапамила заметно увеличивается, что говорит об индукции ферментов, участвующих в метаболическом пути ксенобиотика.

Для изучения влияния поллютанта на скорость метаболической трансформации верапамила как модельный загрязнитель использовали гексан. Его вводили в инкубируемую массу с S9 в низкой концентрации (10 мкМ) в виде раствора в DMSO или в PBS. Анализ проводили методом хроматомасс-спектрометрии. Полученные результаты показывают, что содержание верапамила уменьшается со временем (см. рисунок). Однако было замечено, что в присутствии гексана, вне зависимости от метода растворения, площади под пиком были меньше, нежели при его отсутствии. Можно предположить, что присутствие гексана может влиять на биотрансформацию верапамила.



Изменение содержания верапамила в пробе от времени инкубации в присутвиии/отсутвиии растворенного различными способами гексана (LCMS-8040, Shimadzu, режим MRM)

© Я. В. Лобанова, 2021

* Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта № FSNM-2020-0024.

Литература

1. Tumiatti V., Fimognari C., Milelli A., Manucra D. Pollutants and Drugs: Interactions and Human Health // Clinical Handbook of Air Pollution-Related Diseases. Springer, Cham, 2018.

2. Anzenbacher P., Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics // Cellular and Molecular Life Sciences. 2001. Vol. 58. № 5–6. P. 737–747.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *EISENIA ANDEI* С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ БИОХИМИЧЕСКОГО БИОМАРКЕРА*

К. О. Малышева, Е. И. Яковлева

Пермский политехнический университет

E-mail: malksen@pstu.ru

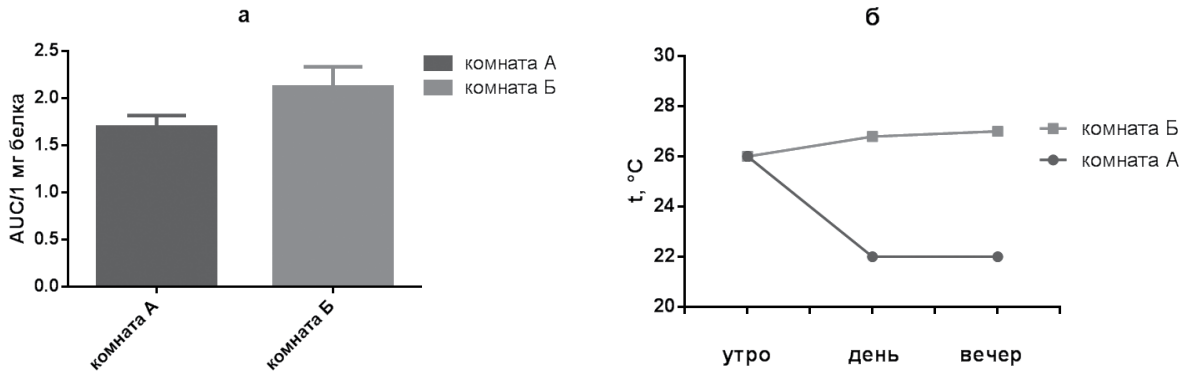
Аннотация

Эксперименты на живых организмах проводятся в стандартных лабораторных условиях, что не отражает изменяющейся обстановки в естественной среде обитания. В ходе отработки методики определения острой токсичности на дождевых червях в фоновых тестах оценивали влияние органических растворителей различной природы для растворения будущего исследуемого вещества. Влияния органических растворителей на выживаемость червей не обнаружено за исключением галогенированных углеводородов. На активность холинэстеразы не повлиял ни один из исследуемых растворителей, однако обнаружено влияние температурных режимов.

Температура и другие условия обитания живых организмов в естественной среде отличаются от экспериментальных, что затрудняет экстраполяцию экспериментальных данных, которые могут расходиться при изменении хотя бы одного фактора. В частности обнаружено, что токсическое воздействие пестицидов на червей *Eisenia foetida* выше при высокой температуре (25 °С), чем при низкой (15 °С) в стандартном контактном тесте определения острой токсичности [1].

Этот тест включает воздействие на червей тестируемого вещества посредством контакта дождевого червя с влажной фильтровальной бумагой, предварительно обработанной раствором ксенобиотика с последующим удалением растворителя [2]. Согласно логике теста, используемый растворитель не должен влиять на червей, поскольку он предварительно удален. Для оценки возможного влияния природы растворителя на червей после скриннингового теста мы дополнительно использовали биомаркер нейротоксического воздействия — холинэстеразу. По литературным данным известно, что у разных организмов холинэстеразы чувствительны к температуре. Длительное воздействие повышенной температуры на подземного жука *Parvospeonomus canyellesi* вызвало повышение активности холинэстеразы, что указывает на тепловой стресс в нервной системе [3].

При отработке методики скриннингового теста в качестве контроля использовалась дистиллированная вода, а в качестве растворителей были выбраны ацетон, гексан, этилацетат, хлороформ, дихлорэтан, четыреххлористый углерод. В результате выживаемость в целом оказалась ниже с галогенированными растворителями. Мы предположили, что при работе с этими растворителями необходимо более тщательное их удаление с фильтровальной бумаги. На уровень активности холинэстераз дождевых червей растворители не оказали значительного влияния, в том числе и галогенированные углеводороды, четыреххлористый углерод и хлороформ в сравнении с дистиллированной водой: средние значения активности холинэстеразы на 1 мг белка 1,6 ± 0,4, 1,6 ± 0,2, 1,7 ± 0,3 соответственно. Однако было обнаружено влияние различных температурных режимов на активность холинэстеразы у дождевых червей (см. рисунок).



Активность холинэстеразы на 1 мг белка (*а*); суточные изменения температуры (*б*)

© К. О. Малышева, Е. И. Яковлева, 2021

* Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта № FSNM-2020-0024.

Для выявления зависимости изменения активности холинэстеразы от температуры были проведены дополнительные тесты. Дождевые черви *Eisenia andei* находились в разных комнатах при разных температурных режимах, фильтровальная бумага была обработана только дистиллированной водой. По истечении 48 часов оценивались жизнеспособность червей, а также уровень активности холинэстеразы методом Эллмана [4].

В результате по окончании теста выживаемость червей оказалась в пределах нормы. Уровень активности холинэстеразы был выше у червей в комнате Б, где температура была постоянно высокой. В комнате А утренняя температура не отличалась от температуры в комнате Б, а постоянная температура днем была относительно низкой (+23 °С) и уровень активности холинэстеразы был меньше, чем у червей из комнаты Б.

При проведении теста острой токсичности в контролируемых лабораторных условиях по регламентируемым нормам необходимо помнить, что температура в естественных условиях скачкообразна и непостоянна. Поэтому при оценке токсического действия ксенобиотика на живой организм целесообразно учитывать результаты, полученные при нескольких температурных режимах, а не при одной постоянной температуре.

Литература

1. Velki M., Ecimovic S. Changes in exposure temperature lead to changes in pesticide toxicity to earthworms: Apreliminary study // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2015. № 5. P. 774–784.

2. ГОСТ 33036-2014. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для дождевых червей. Введ. 2015-08-01. М.: Стандартинформ, 2019.

3. Pallares S., Sanchez-Hernandez J.C., Colado R. et al. Beyond survival experiments: using biomarkers of oxidative stress and neurotoxicity to assess vulnerability of subterranean fauna to climate change // Conservation Physiology. 2020. Vol. 8.

4. Ellman G.L., Courtney K.D. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochemical Pharmacology. 1961. Vol. 7. P. 88–95.

ФОТОИНДУЦИРУЕМАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*

Р. А. Мифтахов, А. Ю. Иконникова, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

E-mail: mr.miftahov20@yandex.ru

Аннотация

Изучен простой процесс модификации пленок из циклического олефинового сополимера (ЦОС) методом УФ-индуцируемой полимеризации для ковалентной прививки олигонуклеотидов. Флуоресцентный анализ полимерной поверхности продемонстрировал наличие флуоресцентно меченных ДНК-зондов на поверхности ЦОС пленки. Плотность прививки олигонуклеотидов на модифицированной поверхности составила 32 пм/см^2.

Эффективность анализа на основе микрочипов существенно зависит от плотности функциональных биомолекул, закрепленных в ячейках микрочипа. В последнее время исследователи прилагают усилия для разработки новых стратегий функционализации полимерных поверхностей, которые обеспечат эффективную иммобилизацию и стабильность биомолекул. ЦОС представляет особый интерес среди полимерных подложек благодаря его теплопроводности, прозрачности и низкой автофлуоресценции. Однако поверхность ЦОС химически инертна и, следовательно, не имеет функциональных участков для ковалентной иммобилизации ДНК. Существует множество методов для активации поверхности ЦОС, среди которых особый интерес представляет УФ-индуцируемая полимеризация. Данный подход обладает следующими преимуществами: высокой эффективностью, низкой стоимостью обработки, легким масштабированием и, самое важное, возможностью распределения привитых полимерных цепей на поверхности по заданному шаблону.

В данной работе для получения функциональных групп, прикрепленных к поверхности, сначала покрыли полимерную подложку тонким слоем бензофенона в ацетоне, затем нанесли раствор мономеров акриловой кислоты и метакриловой кислоты. Затем подложку облучали ультрафиолетовым светом через фотомаску из кварцевого стекла. Под воздействием УФ бензофеноновые группы, сорбированные на поверхности, подвергаются n–π* переходу в бирадикальное триплетное состояние, которое способствует отрыву атома водорода от соседних C–H групп, присутствующих в непосредственной близости. Следовательно, образуются радикалы, которые могут инициировать рост цепи от поверхности, приводящей к реакции образования «полимерных щеток», обладающих высокой концентрацией карбоксильных групп. При этом поверхность вне шаблона фотомаски остается неизменной. Активацию образовавшихся карбоксильных групп проводили с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом. Активированные карбоксильные группы ковалентно связывали с модифицированными олигонуклеотидами с аминогруппой на 5`-конце и флуоресцентным красителем Cy3 на 3`-конце (см. рисунок, *а*).

Регистрацию флуоресцентных сигналов и количественное определение концентрации функциональных групп проводили методом цифровой флуоресцентной микроскопии [1]. Плотность прививки олигонуклеотидов на модифицированной поверхности составила 32 пм/см^2.

Функциональность иммобилизованных ДНК-зондов была подтверждена в гибридизационном анализе с флуоресцентно меченой (Cy5) ДНК-мишенью (см. рисунок, *б*).

Ключевой особенностью процесса является то, что он позволяет получать ячейки с высокой емкостью карбоксильных групп. Простота процесса формирования активных групп для иммобилизации биомо-

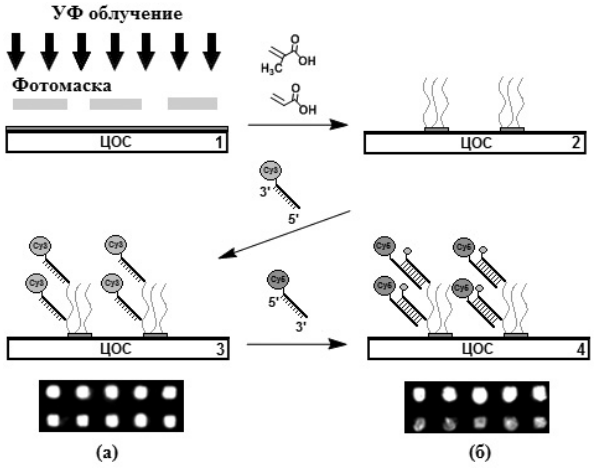


Схема фотоиндуцируемой модификации поверхности ЦОС, снимок иммобилизованных зондов на канале флуоресценции красителя Cy3 (*а*), снимок после гибридизации на канале флуоресценции Cy5 (*б*)

© Р. А. Мифтахов, А. Ю. Иконникова, А. В. Чудинов, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №20-14-00287.

лекул открывает путь для дальнейшего развития технологии многопараметрического анализа ДНК в закрытой микросистеме (лаборатория на чипе).

Литература

1. Мифтахов Р. А., Лапа С. А., Шершов В. Е. и др. Получение активных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки и количественный анализ этих групп с помощью цифровой люминесцентной микроскопии // Биофизика. 2018. Т. 63(4). С. 661–668.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО МУЛЬТИМЕРНОГО ПОЛИПЕПТИДА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА

М. Д. Моллаев [2], Е. Д. Никольская [1], А. И. Заболотский [3],
М. Б. Сокол [1], М. Р. Моллаева [1], М. В. Чиркина [1], Н. Г. Яббаров [1]

[1] Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН
[2] Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва
[3] Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E-mail: ElenaNikolskaja@gmail.com

Аннотация

Основной целью при создании современных терапевтических противоопухолевых препаратов является разработка средств направленного действия. В качестве векторных молекул могут выступать низкомолекулярные вещества, а также макромолекулы, например белки и пептиды. Рецептор-опосредованный эндоцитоз — основной механизм, при помощи которого эукариотические клетки поглощают большинство внеклеточных материалов. Наличие рецепторов альфа-фетопротеина (РАФП) на опухолевых тканях различной этиологии позволяет использовать АФП в качестве универсального онкофетального биомаркера для диагностики и лечения опухолевых заболеваний. R. Schmid и R. Moro определили рецептор-связывающую последовательность АФП — пептид KQEFLIN.

Целью данной работы являлись разработка и оптимизация метода получения рекомбинантного пептидного фрагмента третьего домена альфа-фетопротеина человека r3DAFP23 (PWGVALQTM**KQEFLIN**LVKQKPQITD).

Результаты

Одним из основных методов производства пептидов является твердофазный химический синтез. В качестве альтернативного метода применяют экспрессию рекомбинантных длинных пептидов в клетках про- и эукариот, поскольку это экономично, а технология масштабируема. Однако получение коротких пептидных последовательностей рекомбинантным методом затруднительно в связи с низким уровнем экспрессии, увеличенной подверженностью к протеолитическому гидролизу и сложностью выделения. Для решения этой проблемы рекомбинантный пептид обычно экспрессируют с фьюжн-партнером, который обеспечивает его агрегацию в тельца включения, что облегчает его выделение. Данная методика заключается в создании вектора экспрессии, содержащего ген, кодирующий определенное количество повторов пептида, соединенных через линкер, который после экспрессии и очистки будет расщеплен для высвобождения мономеров (рис. 1).

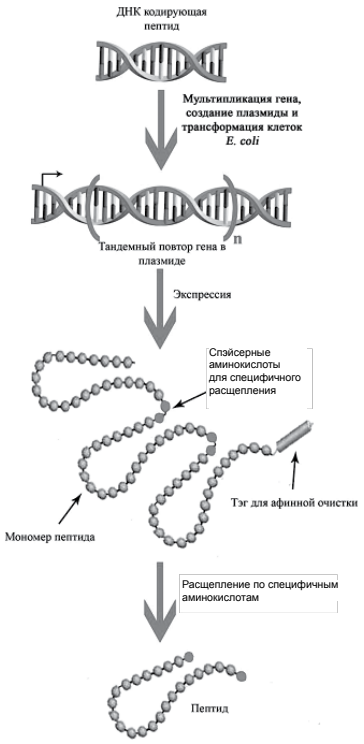


Рис. 1. Принципиальная схема экспрессии пептидов в тандемных повторах

Химически компетентные клетки E.coli BL21(DE3) были трансформированы плазмидами pET28a(+), содержащими от 1 до 14 тандемных повторов r3DAFP23, полученных по схеме, представленной на рис. 1. Трансформанты отбирали по уровню экспрессии рекомбинантного белка (рис. 2).

Рекомбинантный тандемный пептид ожидаемой молекулярной массы экспрессируется только в штаммах от BL21(DE3)/r3DAFP23Pep1 до BL21(DE3)/r3DAFP23Pep5. Денситометрический анализ электрофореза показал, что наибольшим уровнем экспрессии обладал штамм BL21(DE3)/r3DAFP23Pep5.

Были выделены тельца включения, содержащие r3DAFP23Pep5, и подобран двухэтапный метод очистки: на Ni^{2+} иминодиацетатной сефарозе и последующее высаживание в деионизованной воде.

Оптимальными условиями расщепления кислотолабильной связи аспартат-пролил для данного полипептида являлись 75 % муравьиная кислота в течение 3 дней при 37 °C. Проведено подтверждение соответствия

© М. Д. Моллаев, Е. Д. Никольская, А. И. Заболотский, М. Б. Сокол, М. Р. Моллаева, М. В. Чиркина, Н. Г. Яббаров, 2021

молекулярной массы целевого продукта и аминокислотной последовательности полученного пептида (3026,3, PWGVALQTM**KQEFLIN**LVKQKPQITD) методом масс-спектрометрии.

Проведение ИФА показало ингибирование связывания АФП с выделенной фракцией рецепторов из клеток MCF-7 при инкубации с различными избытками пептида, что говорит о его непосредственном взаимодействии с рецепторами и перспективой применения в качестве векторной молекулы при создании адресных систем доставки противоопухолевых препаратов.

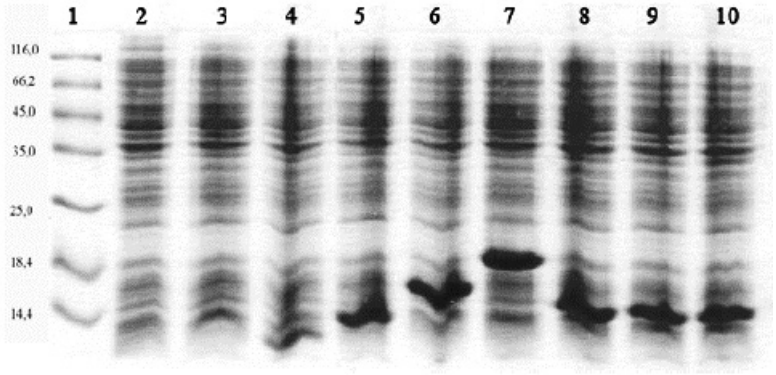


Рис. 2. Электрофореграмма общего клеточного белка трансформантов BL21(DE3)/r3DAFP23. *1* — стандарты молекулярных масс; *2* — до индукции IPTG; *3–10* — BL21(DE3)/r3DAFP23repN (где *N* = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 14 соответственно) после индукции IPTG

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ С ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНОМ

М. Р. Моллаева [1], Н. Г. Яббаров [1], М. Б. Сокол [1], М. В. Чиркина [1], А. П. Каплун [2], Е. Д. Никольская [1]

[1] *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*
[2] *МИРЭА — Российский технологический университет, Москва*

E-mail: mollaevamariia@gmail.com

Аннотация

Оптимизация процесса получения полимерных частиц, содержащих комплексы тетрафенилпорфиринов с металлами, с помощью планов Бокса — Бенкена позволила значительно повысить общее содержание металлопорфиринов и снизить средний диаметр частиц.

Металлопорфирины (МЕП) — это высокоактивные каталитические комплексы на основе порфиринов и металлов, участвующие в процессах дыхания и фотосинтеза. Чаще всего МЕП применяются для лечения опухолевых заболеваний в составе фотодинамической или каталитической терапии. В данном исследовании использовались тетрафенилпорфирины марганца (MnClТФП), никеля (NiТФП) и кобальта (CoТФП). Поскольку соединения обладают ограниченной растворимостью в воде, их включали в полимерные частицы, которые позволяют преодолеть биологические барьеры и значительно повысить эффективность лекарственного средства. Чаще всего в качестве полимерной матрицы применяется сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА), поскольку он обладает механической прочностью и биоразлагаем. Для получения частиц, содержащих MnClТФП и NiТФП был выбран метод одинарного эмульгирования, а для CoТФП — преципитации.

Оптимизация параметров получения полимерных частиц является сложным технологическим процессом, в котором каждая стадия оказывает влияние на профиль высвобождения активного вещества (скорость перемешивания, время гомогенизации, концентрация поверхностно-активного вещества, количество органического растворителя). Часто план оптимизации включает в себя изменения независимых факторов в пределах крайних значений. Для того чтобы добиться многопараметровой оптимизации и уменьшения количества экспериментов, был использован план Бокса — Бенкена. В данном исследовании план эксперимента представлял собой двухуровневый трехфакторный план с пятью повторениями центральных факторов, что составило 17 экспериментов по получению частиц, содержащих МЕП. В качестве независимых факторов, влияющих на физико-химические характеристики частиц, были выбраны количество ПЛГА (мг) (X_1), концентрация стабилизатора эмульсии (поливинилового спирта, %) (X_2) и соотношение органической и водной фаз (X_3) (хлороформ — MnClТФП; хлористый метилен — NiТФП; ацетон — CoТФП). Общее содержание МЕП в частицах (Y_1) и их средний диаметр (Y_2) были выбраны в качестве зависимых переменных, поскольку данные факторы являются наиболее значимыми для эффективности накопления МЕП в опухолевых тканях.

Сравнение предсказанных и экспериментальных данных для частиц, содержащих МЕП

Частицы, содержащие МЕП	Условия получения	Отклик	Предсказанные данные	Экспериментальные данные	Ошибка, %
NiТФП	X_1: 5 мг X_2: 1,47 % X_2: 1 : 7 желательность: 0,835	Y_1, %	11,1	10,1	–9,9
		Y_2, нм	322,9	296,9	–8,8
CoТФП	X_1: 7,2 мг X_2: 2 % X_2: 1 : 5 желательность: 0,750	Y_1, %	8,7	10,3	15,2
		Y_2, нм	344,5	410,5	16,1
MnClТФП	X_1: 5 мг X_2: 1,42 % X_2: 1 : 5,6 желательность: 0,837	Y_1, %	28,9	22,6	–27,8
		Y_2, нм	205,2	247,4	17,1

© М. Р. Моллаева, Н. Г. Яббаров, М. Б. Сокол, М. В. Чиркина, А. П. Каплун, Е. Д. Никольская, 2021

Рассчитанные коэффициенты уравнений регрессии и F-распределения подтвердили адекватность математической модели, что позволило определить оптимальные теоретические условия для получения частиц, содержащих МЕП с минимальным размером и максимальным общим содержанием. Сравнение предсказанных и экспериментальных данных для двух откликов показало близость значений и низкую относительную погрешность. Стоит отметить, что наилучшие значения зависимых переменных были представлены при схожих значениях независимых переменных. Вероятно, выявление данных параметров связано со схожими характеристиками МЕП, например, растворимостью в органическом растворителе и в водном растворе. Таким образом, за счет плана оптимизации Бокса — Бенкена удалось разработать частицы с наилучшими параметрами, использовав схожие условия получения. Основываясь на результатах, можно предположить, что данные условия могут помочь исследователям для оптимизации процесса получения частиц на основе МЕП.

АНАЛИЗ БИОДЕГРАДАЦИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Р. Т. Нигматуллина, А. М. Халиуллина, Е. В. Перушкина, А. М. Сафина, Д. Ф. Садыкова, Е. М. Готлиб

Казанский национальный исследовательский технологический университет

E-mail: rezedka2000@inbox.ru

Аннотация

Исследованы модифицированные образцы эпоксидной смолы, в состав которых были включены природный и синтетический волластониты, а также зола рисовой шелухи. В ходе эксперимента проанализирована биодоступность данных материалов для микроорганизмов почвы с использованием модифицированного метода Штурма.

Одной из экологических проблем современности является загрязнение окружающей среды, так как количество образующихся отходов превышает объемы перерабатываемых. С развитием химической промышленности создаются синтетические полимерные материалы, которые после короткого срока использования хранятся десятки лет на полигонах твердых бытовых отходов без видимого химического и биологического повреждения. Актуальной задачей при утилизации промышленных полимеров является повышение их биоразлагаемости в почве.

Одним из путей ее решения является совмещение синтетического полимерного материала с модифицирующей добавкой из природных компонентов [1]. С этой целью исследуют биоразлагаемые полимеры, способные подвергаться воздействию окружающей среды и в дальнейшем — деструкции микроорганизмами.

Объектами исследования являлись образцы эпоксидной смолы, модифицированные добавлением природного и синтетического волластонита с введением золы рисовой шелухи, полученной при разных температурах.

Для анализа биодоступности материалов использовали модифицированный метод Штурма [2], основанный на инкубировании почвенных образцов в закрытых сосудах в присутствии полимерных композитных материалов. На начальном этапе была определена дыхательная активность почвы в 1-й и 2-й сериях экспериментов, которая составила 4,733 и 1,527 мг $C\text{-}CO_2$ г/ч соответственно. Полученные значения свидетельствуют о различии в компонентном составе почвы и разной активности почвенной микрофлоры.

Исследование добавки природного волластонита Миволл в составе ЭД-20+Миволл показало, что дыхательная активность в присутствии контрольного образца ЭД-20 и опытного образца ЭД-20+Миволл принимала одинаковые значения (2,5 мг $C\text{-}CO_2$ г/ч).

При внесении в почву модифицирующих добавок — порошков синтетического волластонита ЗРШ 800 °С и синтетического волластонита ЗРШ 900 °С в количестве 1 г (концентрация 20 % от массы почвы) отмечено отсутствие дыхательной активности, что связано с отрицательным воздействием их высоких концентраций на почву. На следующем этапе проводили тестирование на биодоступность образцов ЭД-20 + Волл800 °С и ЭД-20 + Волл900 °С в 1-й и 2-й сериях экспериментов с разными образцами почвы. Результаты оценки изменения респираторной активности почвы в присутствии золы рисовой шелухи приведены в таблице.

Дыхательная активность почвы в присутствии модифицированных образцов эпоксидной смолы с добавлением синтетического волластонита и золы рисовой шелухи (1-я и 2-я экспериментальные серии)

Опытная система	Концентрация мг $C\text{-}CO_2$ г/ч	
	1 ЭС	2 ЭС
Почва + ЭД-20 + Волл800 °С	5,618	3,054
Почва + ЭД-20 + Волл900 °С	5,042	2,020

Результаты научно-исследовательской работы по тестированию эпоксидной смолы, модифицированной добавлением синтетического волластонита и золы рисовой шелухи, полученной при температуре 800 °С, отразили биодоступность материала для почвенного биоценоза. Создание композитных полимерных материалов с введением исследуемых добавок позволит увеличить степень их биологической деструкции в почве на первом этапе процесса биодеградации отходов.

© Р. Т. Нигматуллина, А. М. Халиуллина, Е. В. Перушкина, А. М. Сафина, Д. Ф. Садыкова, Е. М. Готлиб, 2021

Литература

1. Готлиб Е. М., Вдовина Т. В. Повышение биоразлагаемости эпоксидных материалов за счет модификации растительными маслами и их кислородсодержащими производными // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т 10. № 4. С. 700–707.

2. Селивановская С. Ю., Галицкая П. Ю. Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем. Казань, 2014. С. 13.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МИКРОБИОТЫ СЛЕПОГО КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ*

А. А. Николаева, Г. Ф. Лутфуллина, А. М. Марданова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: azazel1212@rambler.ru

Аннотация

Представлены данные по анализу таксономического состава бактериального сообщества слепого кишечника цыплят-бройлеров кросса Кобб500. Показано, что микробиота слепой кишки претерпевает серьезные изменения в процессе роста цыплят и представлена главным образом представителями *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, соотношение которых зависит от возраста.

Микробиота желудочно-кишечного тракта играет важную роль в метаболизме, росте, усвоении питательных веществ и общем состоянии здоровья птиц. Понимание принципов колонизации кишечника цыплят бактериальной микробиотой позволяет манипулировать кишечной микрофлорой с целью улучшения переваривания корма и повышения жизнеспособности у птиц. Целью данной работы был анализ таксономического разнообразия микробиоты слепого кишечника цыплят-бройлеров Кобб-500.

Эксперимент *in vivo* проводили на 30 цыплятах кросса Кобб500 в условиях фермерского хозяйства «Лачын». В рационе цыплята получали стандартные для каждого возраста комбикорма: Стартер, Рост и Финишер. Образцы содержимого слепой кишки трех цыплят отбирали в стерильные фальконы после убоя на 7, 21, 28, 35 сутки. Общую геномную ДНК выделяли из 0,5 г содержимого слепой кишки каждого отдельного цыпленка с использованием коммерческого набора QIAamp Fast DNA Stool Mini (QIAGEN, Германия) согласно протоколу. 16S ампликонный метагеномный анализ проводили с помощью высокопроизводительного секвенатора на платформе Ilumina MiSeq (США). Анализ данных секвенирования проводили в программе QIIME версии 1.5.0.

В бактериальном сообществе слепого кишечника цыплят-бройлеров на протяжении всего периода содержания доминировали представители фил *Firmicutes* и *Bacteroidetes,* доля которых составляла до 78,8–89,8 %. Количество фирмикут снизилось к 21 суткам от 40,1 до 23,5 %, но затем увеличилось более чем в 2 раза на 35 сутки (59 %). Основные семейства *Firmicutes*, колонизирующие слепую кишку кур, включали *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*, в меньшей степени *Veillonellaceae*, *Lactobacillaceae* и *Acidaminococcaceae*. Наибольшая доля *Bacteroidetes* была представлена на 21 и 28 сутки (62,5 и 73,4 %), тогда как на время убоя (35 сутки) их численность снизилась до 29 %. Анализ метагенома на уровне семейства показал преобладание представителей *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* и *Porphyromonadaceae*.

В меньшей степени в слепой кишке цыплят были представлены филы *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Euryarchaeota* и *Verrucomicrobia*. Сравнительный анализ показал, что доля *Proteobacteria* достигала максимума (8,2 %) к 7-м суткам, а затем снижалась до 0,7 % на 35-е сутки. Филум представлен главным образом представителями семейств *Helicobacteraceae*, количество которых уменьшалось от 5,4 % на 7-е сутки до 2,2 % на 21-е сутки и не обнаруживалось на 28-е и 35-е сутки, и *Sutterellaceae* с максимальной численностью на 7-е сутки (2,1 %). Количество *Actinobacteria* было максимально на 28-е сутки (0,7 %), таксономически филум был представлен единственным семейством *Bifidobacteriaceae*. Количество представителей семейства *Methanobacteriaceae,* филы *Euryarchaeota,* возрастало на 35 сутки роста до 9,2 %, что может объясняться большей потребностью молодых растущих бройлеров в SCFA. Семейство *Verrucomicrobiaceae*, члены филума *Verrucomicrobia*, в значительных количествах были обнаружены только на 21 (6,6 %) и 28 (0,8 %) сутки роста.

Таким образом, структура микробиоты слепой кишки претерпевает серьезные изменения в процессе роста цыплят-бройлеров. Бактериальное разнообразие ЖКТ тесно связано с метаболизмом цыплят-бройлеров и его здоровьем, что позволяет улучшать производительность бройлеров через модуляцию кишечной микробиоты.

© А. А. Николаева, Г. Ф. Лутфуллина, А. М. Марданова, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект «Аспиранты» 20-34- 90130).

AN APPROACH TO IMPROVING THE EFFICIENCY OF A BIOTECHNOLOGICAL PROCESS USING 3D STRUCTURES*

V. I. Rumyantceva, V. V. Vinogradov

ITMO University, Saint Petersburg

E-mail: valeriya_rumyantceva@scamt-itmo.ru

Abstract

As an approach to improving the efficiency of the biotechnological process, 3D printing of composite structures containing entrapped cells of microorganisms with controlled assembly properties and the function of repeated use is proposed.

The problem of an inefficient way of disposing of food waste is of increasing interest. Thus, during the multi-tonnage production of bread and bread products, no more than 10 % of unused products are processed. At the same time, most of it is suitable for decomposition and obtaining a new type of production raw materials. Fermentation processes are used in the manufacture of many functional products. However, the continuous process of updating the enzymatic substrate with its subsequent immobilization leads to the fact that the technology becomes economically impractical for mass availability of the product.

To date, there are several developments to improve the efficiency of using the enzymatic process in biotechnological production. For example, reactivation of aggregated proteins or irreversibly denatured enzymes is used, desorption of the enzyme from the walls of the reaction vessel. At the same time, they are not able to meet all the requirements of accessibility, efficiency and security.

Additive technologies are becoming increasingly popular for solving many production problems. It is assumed that the creation of "living" enzyme framework structures focused on increasing the efficiency and at the same time environmental friendliness of production will allow overcoming the difficulties associated with the instability of the enzyme, the duration of its action and the multiple use. Extrusion volumetric printing is able to solve a number of problems related to the dosing of individual structures of the general system, the direction of their assembly and stable layer-by-layer formation of structures.

A variant of introducing a reusable enzymatic design into biotechnological production is shown in Fig. 1.

In this paper, the potential of using additive technology for the formation of multicomponent 3D structures with entrapped yeast cells is investigated.

As a promising technology, printing with near-ultraviolet radiation curing was used, through which it is possible to obtain a product with a low degree of contamination and a high degree of survival of target cells.

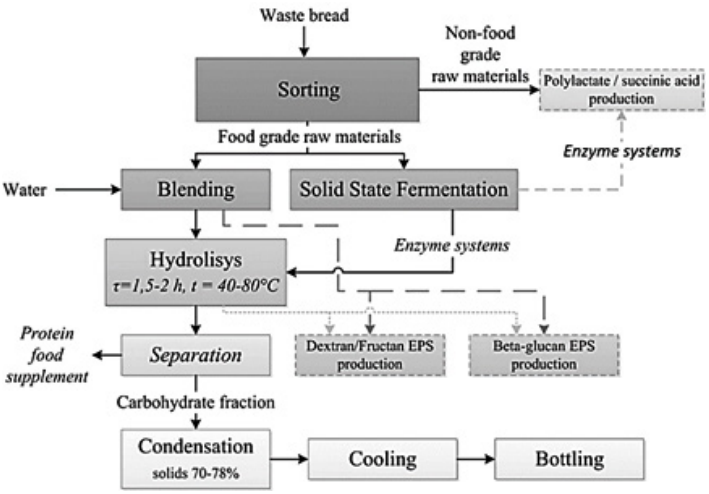


Fig. 1. Scheme of processing of secondary bread raw materials using 3D enzyme systems

The synthesis of a matrix for bioinks was carried out: nanocellulose sol (N-CNC), binding (polyethylene glycol dimethacrylate) and crosslinking (phenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphinate of lithium) components, culture of microorganisms in the form of a yeast substrate. The structures were printed in the form of a cuboid lattice. A dense structure with the shape of a hanging drop was used as a control. The optimal ratio of components was 90:10:9 in favor of the content of nanocellulose.

The alcohol release was determined by its total content in the working system with the replacement of the nutrient medium every 48 hours (Fig. 2).

Based on experimental data, it was calculated that the developed structures are capable of processing glucose-containing medium to ethyl alcohol in an amount of about 1.5 % on average during five stages of use. For spherical structures, this indicator is lower, and at the

© V. I. Rumyantceva, V. V. Vinogradov, 2021

* This research was funded by the Ministry of Education and Science, grant № 390434.

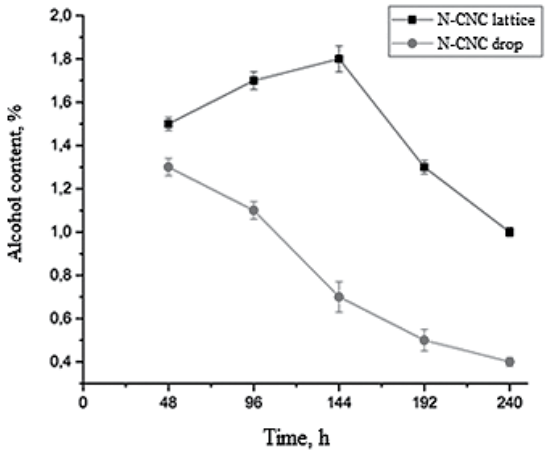


Fig. 2. Dynamics of the release of ethyl alcohol from a glucose-containing substrate

same time it is not preserved at further stages of use. Over time, up to 144 hours, the system undergoes minor changes in stability, but the processing of the remaining substrate continues to be carried out.

The obtained results indicate the potential of using a multicomponent 3D structure to reduce the use of expensive enzymatic raw materials in the biotechnological process, reduce the production cycle time, as well as to build an environmentally correct cyclic production system.

MAGNETICALLY CONTROLLED CERAMIC NANOCOMPOSITE AS AN AGENT FOR EFFECTIVE BIOFILMS ERADICATION*

V. I. Rumyantceva, E. I. Koshel

ITMO University, Saint Petersburg

E-mail: viktoriya_rumyantceva@scamt-itmo.ru

Abstract

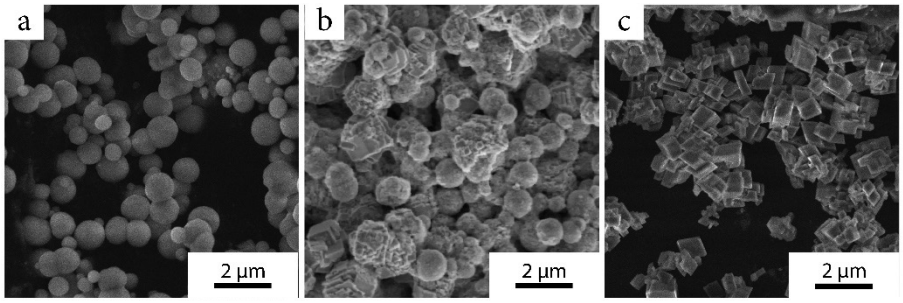
A magnetically controlled ceramic nanocomposite with controlled release parameters of the active component under the influence of a high-frequency magnetic field has been proposed as the most effective strategy for combating biofilms.

Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces is a critical problem in a wide variety of fields, from agriculture and industry to medicine. Therapy for biofilm-related inflammation is a serious problem because bacteria within the biofilm are significantly more resistant to common antibacterial agents effective against planktonic bacterial cells. The low efficiency of biocides against biofilms is determined by their mechanical and chemical properties, which do not allow penetration into its depth. Therefore, for effective antibacterial therapy, biofilm should be disintegrated beforehand.

With the increase in the number of various complications kinds caused by the formation and development of biofilms, the need for the effective therapy development is constantly growing. Instead of using traumatic and expensive procedures for removing biofilm from the surface, to solve the described problem, it is proposed to use controlled processes of mechanical biofilm destruction and subsequent intensive release of the active biocidal component from the used composite matrix frame. Thus, biocide-conjugated nanoparticles and nanostructured composites entrapped with active substances are the most promising means for these purposes due to their small size and unique physicochemical properties.

As a result of the comparative analysis for these purposes, materials were selected for the development of new highly efficient nanostructured composites. Among them, the most promising are magnetic biocompatible nanoparticles for imparting unique properties to the composite, calcium carbonate and its derivatives in the form of a ceramic framework. The optimal protocol for obtaining a nanocomposite consists of the magnetite nanoparticles synthesis by the method of coprecipitation using ultrasound and the microparticles synthesis on their basis by the method of co-condensation with the addition of saturated solutions of calcium chloride, sodium carbonate and a bioactive compound.

In the course of studying the obtained nanostructured composite properties, the mechanisms of slow, spontaneous, and fast, initiated, release of the active component through the matrix framework were noted. This feature is due to the presence of several polymorphic modifications in calcium carbonate, which expand the controlled composite parameters (See Figure). At the same time, the magnetic system made it possible to purposefully localize biocidal components in the focus of infection and reacted differently to changes in the frequency of the external magnetic field, which can be used for various therapy purposes.



The transition of calcium carbonate particles from the vaterite phase to the calcite phase, monitored by SEM

The effectiveness of the developed nanocomposite antibacterial action against the formed biofilms was determined using model strains of microorganisms: gram-positive *S. aureus* and gram-negative *E. coli*. As a biocide, the antibiotic ciprofloxacin was used, which has a broad action spectrum against various types of bacteria. As expected, the antibiotic immobilized in the nanocomposite showed a higher efficiency against the formed biofilms than the antibiotic in its original form. Based on the data obtained, it is possible to judge the synergistic effect of the nanocomposite and ciprofloxacin, first of all, for gram-positive bacterial species — the efficiency against *S. aureus* was 72 %.

Thus, the advantages of using magnetic nanocomposite materials for the complex control of biofilm formations, in particular on abiotic surfaces, have been proven, which is a promising groundwork for further research in this area.

© V. I. Rumyantceva, E. I. Koshel, 2021

* This research was funded by the Russian Science Foundation, grant № 19-74-00125.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ЛИПАЗЫ А *BACILLUS NATTO* В СИСТЕМЕ *BACILLUS SUBTILIS* С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЕКТОРА PBSU-LIPA *

В. А. Северина [1], К. В. Старожилова [1], Д. Н. Щербаков [1,2]

[1] *Алтайский государственный университет, Барнаул*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

E-mail: saini_san@mail.ru

Аннотация

Липаза А — щелочной фермент рода *Bacillus*, катализирующий гидролиз нерастворимых липидных субстратов. В работе была проведена амплификация нуклеотидной последовательности липазы А *Bacillus natto.* Разработан вектор pBSU-Lip A, обеспечивающий синтез и секрецию фермента *Bacillus subtilis.* Активность фермента липазы А в культуральной среде после культивирования рекомбинантного штамма *B. subtilis* подтверждена с использованием в качестве субстрата оливкового масла.

Липазы — класс ферментов, востребованных в пищевой и медицинской отрасли, некоторые липазы также являются компонентом чистящих средств и ПАВ, используются в производстве биодизельного топлива. В промышленности широко используют липазы, катализирующие гидролиз карбоксиловых эфиров длинноцепочечных ацилглицеринов (≥ 10 атомов углерода) — нерастворимых липидных субстратов, склонных к агрегации в водном растворе. Эти ферменты стабильны в органических растворителях и способны катализировать широкий спектр субстратов без применения дорогостоящих кофакторов. Липаза А является небольшим белком с массой около 20 кДа, продуцируемым *Bacillus subtilis.* В отличие от большинства липаз, липаза А не имеет мобильного домена, закрывающего активный участок фермента, и не проявляет межфазной активации [1].

Среди прокариотических систем получения рекомбинантных липаз все чаще используются *E. coli* и *B. subtilis*. Однако экспрессия белков в системе *E.coli* в основном идет в цитозольном пространстве бактерии, тогда как система *B. subtilis* способна обеспечить синтез и секрецию рекомбинантных белков непосредственно в культуральную среду [2].

В работе был проведен анализ *Bacillus subtilis* штамм MZ1 (выделенного из пчелинного меда) и *Bacillus natto* штамм IAN (из коллекции инжинирингового центра «Промбиотех» АлтГУ) на наличие гена липазы А. Из геномной ДНК штамма *Bacillus natto* с помощью специфических праймеров была амплифицирована нуклеотидная последовательность, кодирующая липазу А. Полученная последовательность была встроена в вектора pBSU-AmyQ-Brx по сайтам гидролиза BamHI и AatII с получением вектора pBSU-LipA. Разработанный вектор содержит сильный синтетический константный промотор *B. subtilis*, способный обеспечить высокий уровень синтеза целевой РНК в этом организме.

Трансформация штамма *B. subtilis* производилась методом электропорации. Для проверки синтеза целевого белка полученные одиночные клоны высеивали в жидкую питательную среду, отбирали культуральную среду после наращивания до OD = 0,6–0,8 через 24, 36 и 48 часов. Анализ белков культуральной среды проводили при помощи электрофореза в ПААГ. На полученной электрофореграмме наблюдали бенд, соответствующий по молекулярной массе липазе А.

Для проверки активности липазы в качестве субстрата использовали оливковое масло. Активность фермента пропорциональна количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе. В качестве контроля использовали липазу А теленка (Caglificio Clerici, Италия). Активность полученной липазы А составила 23,76 нмоль/с.л.

Литература

1. Borrelli G. M., Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications // International journal of molecular sciences. 2015. Vol. 16. № 9. P. 20774–20840.

2. Tanaka T., Yamada R., Ogino C. et al. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology // Applied microbiology and biotechnology. 2012. Vol. 95. № 3. P. 577–591.

© В. А. Северина, К. В. Старожилова, Д. Н. Щербаков, 2021

* Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, номер темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия».

СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА ОПЕРАЦИИ СВОБОДНОЙ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ

П. А. Селиванов

Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург
3-й Военный госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, Санкт-Петербург

E-mail: olliwooood@gmail.com

Аннотация

Разработан метод прогнозирования исхода операции свободной аутодермопластики (САДП) у пострадавших с ожоговой травмой на основе искусственной нейронной сети, входными данными для которой являются клинико-лабораторные показатели, исследуемые в динамике в процессе подготовки пациента к оперативному вмешательству. Определены наиболее значимые клинико-лабораторные показатели в отношении успешности проводимого хирургического лечения.

Введение

Ожоговая травма (ОТ) — одна из лидирующих медико-социальных проблем современного общества. В настоящее время ведущим методом лечения ожоговой травмы является аутотрансплантация кожного лоскута. Одной из главных причин неудач трансплантации кожного лоскута при ожоговой травме является отсутствие объективных методов оценки состояния иммунного статуса пострадавших, а вместе с тем и прогнозирования исхода оперативного вмешательства. Искусственные нейронные сети (ИНС) давно заняли свое прочное место среди методов статистической обработки данных, используемых в медицине для различных целей и задач. Одним из наиболее важных факторов использования данного метода является возможность прогнозирования исхода события. Целью исследования стали изучение и поиск наиболее значимых как анамнестических, так и клинико-лабораторных показателей для дальнейшего построения на их основе ИНС, способной прогнозировать исход оперативного вмешательства.

Материал и методы

Обследовано 64 больных с ОТ в возрасте от 19 до 96 лет, которые обследовались и лечились во ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России и НИИ СП им. И. И. Джанелидзе: 34 мужчины и 30 женщин. Средний возраст составил 48,1 ± 3,54 лет. Все больные имели ОТ I-IIIАБ степени тяжести, всем была проведена САДП. Проанализированы 93 показателя, представленные анамнестическими данными, записями историй болезни, клинико-лабораторными показателями. К клинико-лабораторным показателям относились: общеклиническое, биохимическое исследование крови, определение субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии, определение цитокинового профиля методом иммуноферментного анализа, включающего определение IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, TGF-β, а также определение матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9). Статистическую обработку результатов, а также построение ИНС проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2016, пакета Statistica 12.0 (StatSoft, США).

Результаты

На основании определенных наиболее значимых показателей методом логистической регрессии была построена ИНС, задача которой заключалась в прогнозировании исхода САДП. Внутри нейронной сети исключались наименее значимые показатели и оставлялись показатели, наиболее влияющие на результат-отклик. Была построена ИНС с мощностью на тренировочной выборке 96 %, на тестовой выборке 100 % и на контрольной выборке 93,3 %. В полностью сформированную ИНС вошли 3 показателя из 93 — относительное содержание $CD3^+HLA\text{-}DR^+$, концентрации в сыворотке IL-8 и ММР-9. Весовые коэффициенты показателей превышали значение 1,0 по модулю, что указывало на их значимость по отношению к отклику. Показатели чувствительности выбранной модели составили 98,5 %, специфичности 88 %. Каждому из этих показателей определено пороговое значение методом ROC-анализа. Пороговое значение IL-8 — 46 пг/мл, ММР-9 — 41 нг/мл, $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ — 11,1 %.

Заключение

Неблагоприятными в отношении исхода САДП являются превышения пороговых значений показателей IL-8, ММР-9, $CD3^+HLA\text{-}DR^+$. Расширение алгоритма обследования пациентов с ожогами за счет использования ИНС с целью прогнозирования исхода САДП позволит оптимизировать лечение ожоговых пациентов и минимизировать неблагоприятные исходы хирургического лечения.

© П. А. Селиванов, 2021

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВИН

О. В. Солдатенко, А. А. Карташев

Комратский государственный университет, Республика Молдова

E-mail: icsptia@mail.ru

Аннотация

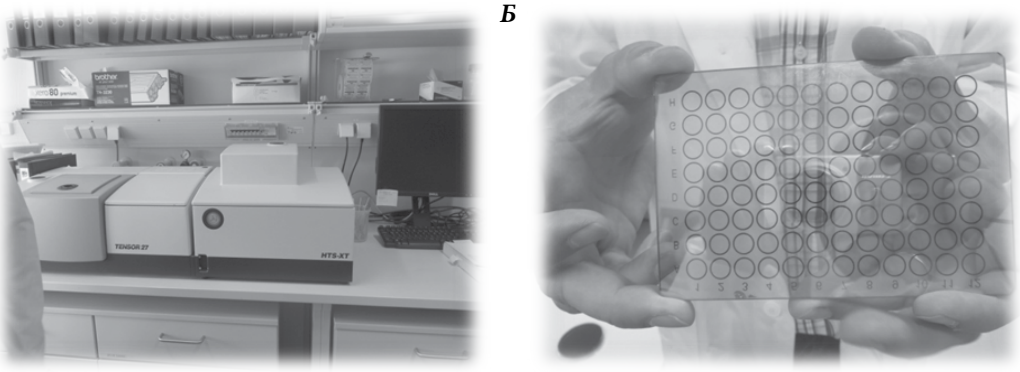
Представлены исследования по установлению видовой принадлежности выделенных на винодельне Purcari дрожжей для производства виноградных вин с использованием традиционного метода идентификации и ИК-спектроскопии Фурье.

Превращение виноградного сусла в вино является сложным биохимическим процессом под влиянием дрожжей. Дрожжи играют ключевую роль в образовании алкоголя при брожении вина. Использование различных методов идентификации винных дрожжей позволяет более глубоко понимать микробиологию получения вина. Правильная идентификация штамма играет важную роль в производстве. В настоящее время разработаны различные методы идентификации микроорганизмов. Традиционные классические методы идентификации наравне с новыми методами используются для идентификации штаммов, однако основной акцент делается на простоту проведения опыта и сокращение времени, а также на эффективность предложенных аналитических методик при сохранении высокой специфичности и точности результатов. В свете вышеизложенного инфракрасная спектроскопия Фурье (ИКС-Фурье) является одним из эффективных методов идентификации штаммов. Спектры ИК-Фурье специфичны для каждого штамма и раскрывают характерные особенности всех клеточных компонентов, таких как жирные кислоты, мембранные белки, внутриклеточные белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Изучение штаммов дрожжей с целью их идентификации включает, прежде всего, получение чистой культуры с использованием жидких и твердых питательных сред и применением специальных микробиологических методов.

В исследованиях учувствовали 64 штамма винных дрожжей спонтанного брожения, выделенных на винодельне Purcari. Чтобы доказать принадлежность изученных штаммов дрожжей, были проведены таксономические идентификационные тесты по Кудрявцеву, которые показали, что из 64 выделенных культур только 31 штамм дрожжей относится к роду Saccharomyces. Дрожжи рода Saccharomyces имеют округлую или эллипсоидальную форму, тогда как микроорганизмы рода Torulopsis имеют сферическую форму, а цилиндрическая форма характерна для микроорганизмов родов Hanseniaspora, Kloeckera. Для родовой идентификации дрожжей использовали различные физиологические признаки, среди которых наиболее важной является способность к анаэробному сбраживанию сахаров. Используя глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, раффинозу, отмечали образование газа, осадка и помутнения. Было идентифицировано 22 штамма Saccharomyces cerevisiae, 6 — Saccharomyces pastorianus, 3 — Saccharomyces bayanus.

Таксономическая идентификация дрожжей с помощью ИКС-Фурье проводилась по следующей методике: культивирование дрожжей на виноградном сусле при 38 °С в течение 72 часов до достижения стационарной фазы роста; распределение суспензии дрожжей в ячейки пластины с последующим термостатированием 60 мин при температуре 45 °С и проведением спектроскопии.

А ***Б***



А — Спектрометр BRUKER TENSOR 27 cu HTS-XT; *Б* — пластина для распределения культуры в ячейки

© О. В. Солдатенко, А. А. Карташев, 2021

В результате проведенного анализа с учетом полученных спектров и сравнения с имеющимися в базе данных было установлено, что все исследованные штаммы дрожжей относятся к трем основным родам: S. cerevisiae (70 %), S. pastorianus (20 %), S. bayanus (10 %).

В ходе исследования было установлено, что идентификации винных дрожжей фенотипическим методом и методом ИКС-Фурье показывают идентичные результаты, однако при использовании ИКС-Фурье сокращается время проведения анализа и исключается использование большого количества сред. Результаты исследования позволили дополнить базу данных, которая будет регулярно расширяться и обновляться. Также чистые культуры пополнили отраслевую коллекцию винных дрожжей Республики Молдова.

ПРОБИОТИЧЕСКАЯ ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ *PROPIONIBACTERIUM JENSENII, PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* И LACTOBACILLUS *BIFERMENTANS*

Н. В. Фотина, Л. С. Дышлюк

Кемеровский государственный университет

E-mail: fotina.natashenka@mail.ru

Аннотация

Одним из важных факторов, влияющих на здоровье человека, является нормофлора желудочно-кишечного тракта. Для нормализации ее качественного и количественного состава предложен пробиотический консорциум в капсулированной форме на основе лакто- и пропионовокислых бактерий.

Значительное влияние на состояние здоровья человека имеет микрофлора желудочно-кишечного тракта. Ее качественный и количественный состав определяет общую метаболическую активность. Изменения в составе микрофлоры связаны с экологической обстановкой окружающей среды, рационом питания, приемом лекарственных препаратов (в особенности антибиотиков), стрессовыми состояниями организма и др.

Для восстановления и активизации нормофлоры организма перспективно включать в рацион продукты, характеризующиеся пробиотической активностью. Роль пробиотиков в организме человека обширна. Основным преимуществом является обогащение облигатной микрофлоры ЖКТ новыми пробиотическими штаммами, а также создание условий для активирования работы собственной микрофлоры (продуцирование витаминов и ферментов, расщепление лактозы и др.).

С целью сохранения максимальной активности пробиотической добавки предложено использование капсул на основе растительных полисахаридов. Это позволит нивелировать влияние стрессовых факторов (температура, действие соляной кислоты и желчи, осмотический и окислительный стресс и др.).

В исследовании использованы штаммы микроорганизмов *Propionibacterium jensenii* В-6085, *Propionibacterium freudenreichii* В-11921, *Lactobacillus bifermentans* В-9462 в следующем соотношении: 1-й вариант — 1 : 1 : 1; 2-й вариант — 3 : 2 : 1; 3-й вариант — 1 : 3 : 2; 4-й вариант — 2 : 1 : 3.

В ходе исследования определено, что максимальный прирост биомассы отмечается для консорциума под номером 1 (*Propionibacterium jensenii* В-6085 : *Propionibacterium freudenreichii* В-11921 : *Lactobacillus bifermentans* В-9462 1 : 1 : 1).

Для капсулирования пробиотической добавки использовали растительные полисахариды (к-каррагинан и альгинат натрия), глицерин и воду.

Для капсулированной формы пробиотической добавки проверяли растворимость в своде и распадаемость в условиях модельной среды кишечного сока. Результаты показали, что полученные пищевые добавки устойчивы к действию воды (наблюдалось набухание структуры капсулы по истечению 2 ч), период распада капсулы в условиях модельной среды составил 14,4 мин, что соответствует требованиям ОФС.1.4.1.0005.15.

Таким образом, в ходе исследования получена капсулированная пробиотическая добавка на основе лакто- и пропионовокислых бактерий, способствующая поддержанию микроэкологического статуса организма человека.

© Н. В. Фотина, Л. С. Дышлюк, 2021

ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-АПТАМЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ CELL SELEX К РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЕ C-KIT*

В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

E-mail: shershov@list.ru

Аннотация

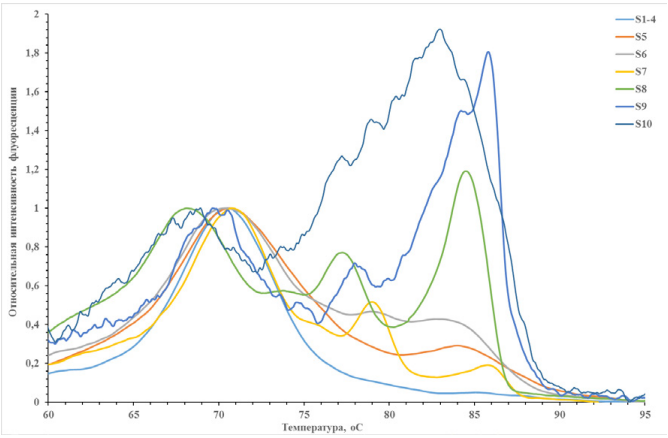
Проведена селекция модифицированных аптамеров на целых эукариотических клетках (Cell-SELEX) с экспонированным на поверхности белком-мишенью c-KIT, характерным для онкологических заболеваний.

Для многих злокачественных новообразований отмечена гиперэкспрессия рецепторной тирозинкиназы c-KIT на поверхности клеток. Контроль уровня экспрессии рецепторного белка c-KIT, а также возможность его блокирования высокоаффинными лигандами представляются одними из важнейших задач современной молекулярной онкологии. Альтернативой моноклональным антителам являются аптамеры — одноцепочечные биополимеры на основе РНК или ДНК, имеющие аффинное сродство к молекулярной мишени. Для ряда белков высокоаффинные аптамеры на основе природных нуклеотидов не могут быть получены, поскольку у природных нуклеотидов не хватает способности к гидрофобным взаимодействиям. Для увеличения аффинности аптамеров в их структуру вводят различные модификации.

Нами синтезирована комбинаторная библиотека случайных последовательностей с вырожденной центральной частью длиной 29 нуклеотидов и фланкирующими праймерами, при этом прямой праймер и комплементарная копия обратного праймера частично комплементарны. На основе вырожденной библиотеки природных олигонуклеотидов методом primer extension при использовании Kod XL ДНК полимеразы получена вырожденная библиотека модифицированных олигонуклеотидов при полной замене dTTP на модифицированный дезоксиуридинтрифосфат, содержащий по C5-положению пиримидинового основания фрагмент фенилуксусной кислоты. Эта модифицированная библиотека использована для получения целевых аптамеров.

Для положительной селекции использовали мышиные клетки с гиперэкспрессией на поверхности клеток человеческого белка c-KIT, для отрицательной селекции — аналогичные мышиные клетки, у которых отсутствует человеческий белок c-KIT. Каждый цикл селекции состоял из следующих основных стадий: инкубация случайной модифицированной библиотеки, содержащей большое число последовательностей, способных образовывать различную вторичную структуру, с клетками с наибольшей экспрессией на поверхности c-KIT; разделение связавшихся и не связавшихся олигонуклеотидов; элюирование связавшихся с белком нуклеотидов и их амплификация; использование амплифицированной двухцепочечной природной ДНК-библиотеки для получения одноцепочечной природной ДНК-библиотеки; получение модифицированной библиотеки на вырожденной природной библиотеке олигонуклеотидов методом primer extension; разделение природной и модифицированной библиотек при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

После каждого цикла селекции определена температура плавления библиотек при использовании ПЦР в режиме реального времени. Из полученных данных следует, что по мере проведения селекции происходит постепенное уменьшение продуктов с низкой температурой плавления и увеличение количества продуктов ПЦР с высокой температурой плавления, то есть происходит обогащение библиотеки продуктами с большей представленностью (с большим числом копий). Обогащенная библиотека случайных последовательностей ДНК будет секвенирована методом секвенирования нового поколения, а найденные индивидуальные последовательности будут синтезированы.



Температурные кривые плавления продукта амплификации после каждого цикла селекции

© В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ-МК № 18-29-09151.

НАНОДИСПЕРСИИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ*

В. А. Щелконогов[1–3], А. М. Иншакова[1], Е. С. Дарнотук[1], А. В. Шипелова[1], Н. С. Шастина[1], О. А. Баранова[2,3], А. В. Чеканов[2,3], К. Д. Казаринов[3], Э. Ю. Соловьёва[2], А. И. Федин[2]

[1] МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[2] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва
[3] Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН, Фрязино

E-mail: vasiliy9999@yandex.ru

Аннотация

Были получены различные нанодисперсии (липосомы и наноэмульсии) с липоевой кислотой (ЛК), с размером частиц от 20 до 190 нм, характеризующиеся 90 ± 5 % эффективностью включения (ЭВ) ЛК в наночастицы (НЧ), ее медленным высвобождением из наноконструкций, а также обладающие высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. Более того, было установлено, что в наноэмульсиях (НЭ) удалось солюбилизировать ЛК в 1,5 раза выше (8 мг/мл), чем в липосомах (Лс, 5 мг/мл), что является существенным преимуществом НЭ по сравнению с Лс. Было показано, что наночастицы, содержащие липоевую кислоту, подавляют агрегацию тромбоцитов (Тц), обусловленную арахидоновой кислотой, и предложен механизм антиагрегационного действия.

Цереброваскулярные заболевания относятся к числу наиболее распространенных форм патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов [1]. Основные патогенетические механизмы развития ишемии головного мозга — это воспалительные реакции, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, деструкция ГЭБ и другие [2, 3]. Терапия данной патологии включает применение препаратов, подавляющих воспалительные процессы, проявляющих антиоксидантное действие и препятствующих образованию тромбов. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии ишемии головного мозга является липоевая кислота. Однако она малорастворима в воде и, попадая в организм, быстро связывается с белками и биодеградирует под действием различных ферментов, быстро выводится из организма, что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия.

Поэтому **целью данной работы** является разработка разных нанодисперсий с ЛК для солюбилизации ЛК в водных растворах, их пролонгированного высвобождения, защиты от биодеградации при попадании в организм, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

Вначале получали нанодисперсии с ЛК (липосомы и наноэмульсии). Лс с ЛК получали из фосфатидилхолина (ФХ) пассивной загрузкой, диспергируя липидную пленку фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР, pH 7,4) с последующей экструзией. Наноэмульсии «масло в воде» с ЛК получали методом ультразвукового диспергирования после инжекции ФБР и стабилизатора в органическую фазу, содержащую ЛК и ФХ. Затем удаляли органический растворитель и избыток воды при пониженном давлении. ζ-потенциал, размер и индекс полидисперсности (ИП) НЧ определяли методом электрофоретического и динамического светорассеяния.

Таким образом были получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК и наноэмульсии с ЛК на основе ФХ, Плюроника Ф68, олигоглицерина (ОГ), ФХ и Ф68, ОГ и Ф68 в ФБР (pH 7,4) с размером частиц от 20 до 190 нм. Разработанные наночастицы были электронейтральными (значения поверхностного заряда не превышали –5,5 ± 3,5 мВ). Нанодисперсии с липоевой кислотой на основе Плюроника Ф68 и олигоглицерина были гетерогенными (ИП > 0,3) и состояли из двух фракций НЧ: 20–70 нм (20–30 %) и 100–190 нм (70–80 %). Полученные результаты связаны с образованием мицелл- стабилизаторов (Ф68 и ОГ) при озвучивании, размер которых был менее 100 нм. Более того, было обнаружено, что полученные наноформы с ЛК были стабильными при длительном хранении (более 24 месяцев) при комнатной температуре.

При сравнении характеристик полученных наноконструкций с ЛК (Лс и НЭ) было обнаружено, что в наноэмульсиях удалось солюбилизировать ЛК в 1,5 раза, использовав максимальную концентрацию ЛК 8 мг/мл, в то время как для получения липосом с ЛК использовали концентрации 1 и 5 мг/мл. При дальнейшем повышении количества ЛК (7–15 мг/мл) в липосомах происходило выпадение ЛК в осадок и образовывались нестабильные дисперсии с размером частиц более микрона. При этом удалось добиться достаточно высокой эффективности включения (ЭВ) ЛК в наноэмульсиях, равной 90 ± 5 %, в то время как ЭВ ЛК в липосомах составляла 75–80 %.

© В. А. Щелконогов, А. М. Иншакова, Е. С. Дарнотук, А. В. Шипелова, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, К. Д. Казаринов, Э. Ю. Соловьёва, А. И. Федин, 2021

* Исследования выполнены в рамках государственного задания (№ гос. регистрации АААА-В20-220091790054-9).

Более того, необходимо отметить, что в полученных наноэмульсиях (в состав которых входил ФХ) содержание ЛК в 2 раза превышало содержание ФХ (ЛК : ФХ — 2 : 1), в то время как в липосомах содержание ФХ, значительно превышало содержание ЛК (ЛК : ФХ — 1 : 8).

С помощью крио-ПЭМ и ЭМ была изучена морфология наночастиц. Было обнаружено, что ФХ-липосомы в основном представляют с собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул сферической формы частиц. В свою очередь наноэмульсии на основе ФХ представляют систему, состоящую из однослойных и мультислойных наноструктур практически одинакового размера.

Затем изучали кинетику высвобождения ЛК из наноконструкций при помощи диффузионной ячейки Франца, загружая в донорную камеру НЭ или липосомы, а в акцепторный отсек — ФБР. В результате исследований было обнаружено, что из липосом за 24 ч высвободилось 45 ± 3 % ЛК, а из НЭ — не более 55 %. Такой процесс высвобождения ЛК из НД может обеспечить пролонгированное действие активной фармацевтической субстанции и длительное поддержание ее терапевтической концентрации в крови.

На следующем этапе работы оценивали влияние полученных наноформ ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) в плазме, выделенной методом оптической агрегатометрии из крови, полученной у здоровых доноров. В качестве индуктора агрегации Тц использовали арахидоновую кислоту (АК), поскольку в результате ее действия образуются различные метаболиты, в том числе и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). В ходе проведенных исследований было установлено, что липосомы с ЛК (1–2 мМ) подавляют агрегацию тромбоцитов на 30–45 % относительно контроля. Все типы нанодисперсий с ЛК (1–4 мМ) на 40–85 % эффективней подавляли агрегацию Тц, обусловленную АК. Водорастворимые препараты и наночастицы без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. По-видимому, ЛК в наноконструкциях способна лучше проникать внутрь клеток за счет взаимодействия липидов с мембраной клеток или в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Антиоксидантное действие наноформ ЛК оценивали по содержанию тиобарбиатурат-активных продуктов (ТБК-АП) и активных форм кислорода (АФК) в образцах обогащенной Тц плазмы (ОТП), инкубированных с АК. В результате было показано, что в процессе агрегации Тц, обусловленной АК, происходит окисление липидов в ОТП. Добавление всех типов НД с ЛК к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению количества ТБК-АП (в 5–20 раз) и АФК (в 2–5 раз). Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали все типы НЭ с ЛК при использовании максимальной концентрации ЛК. Кроме того, было обнаружено, что и водорастворимая форма ЛК, и НЧ без ЛК незначительно влияли на образование продуктов ПОЛ и АФК в плазме крови при активации Тц с помощью АК. Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия ЛК наноформ можно считать ингибирование ею процесса инициирования продуктов пероксидации липидов и АФК с помощью АК.

Таким образом, на основании полученных результатов научной работы можно сделать заключение о том, что все типы нанодисперсий с липоевой кислотой являются перспективными для дальнейших исследований по оценке их антикаогулянтного и нейропротекторного действия на различных экспериментальных моделях *in vivo*.

Литература

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. 328 с.

2. Щелконогов В. А., Дарнотук Е. С., Чеканов А. В. и др. Липосомальный препарат с карнозином и липоевой кислотой: получение, антиоксидантные и антиагрегантные свойства // Биофизика. 2021. Т. 66, № 39. С. 329–337

3. Benjamin E. J., Virani S. S., Callaway C. W. et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association // Circulation. 2018. Vol. 137. № 12. P. 67–492.

РАЗДЕЛ 2

БИОФИЗИКА

I

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ RECA БЕЛКОМ RECX МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА *

А. А. Алексеев[1], Е. А. Знобищева[1], Г. Е. Побегалов[1], А. П. Якимов[1], Д. М. Байтин[2], М. А. Ходорковский[1]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
[2] Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва — Петербургский институт ядерной физики

E-mail: alex35093@gmail.com

Аннотация

На уровне одиночных молекул ДНК изучено взаимодействие RecX с нуклеопротеиновым филаментом RecA. Установлено взаимодействие RecX с неактивной формой филамента RecA и фиксация неактивных состояний в структуре филамента RecA, находящегося в АТФ среде.

Адаптация бактерий к антибиотикам — острая проблема современной медицины. Одним из основных механизмов адаптации, выработанных бактериями, является активация SOS-ответа в ответ на неблагоприятное воздействие среды. Активатор бактериального SOS-ответа — высококонсервативный белок RecA в виде нуклеопротеинового филамента на однонитевой ДНК (онДНК) [1]. Помимо запуска SOS-ответа, филамент RecA играет основную роль в системе рекомбинационной репарации ДНК [2], а также задействуется в горизонтальном переносе генов в ходе натуральной трансформации [3]. Активность RecA регулируется рядом белков кофакторов. Одним из регуляторов является белок RecX. Известно, что RecX ингибирует АТФазную активность филаментов RecA и способствует их разборке [4]. Однако на сегодняшний день механизмы ингибирующего воздействия RecX поняты не до конца.

В рамках данной работы исследовалось влияние белка RecX (*E. coli*) на нуклеопротеиновый филамент RecA-онДНК (*E. coli*). Исследование проводилось на уровне одиночных молекул ДНК при помощи метода оптического захвата в комбинации с микрофлюидной системой ламинарных потоков. Метод оптического захвата позволяет манипулировать одиночными молекулами ДНК и ДНК-белковыми комплексами, прикладывать к ним силы в диапазоне от 0,1 до 100 пН и регистрировать их длину.

В результате исследования получены данные о взаимодействии RecX с различными конформационными состояниями филамента RecA, возникающими в ходе циклов гидролиза и связывания АТФ. Впервые установлено взаимодействие RecX с неактивной формой филамента RecA. Данное взаимодействие стабилизирует неактивную форму филамента RecA и замедляет переход из неактивной формы в активную, который индуцируется связыванием свободных молекул АТФ. В среде с АТФ добавление RecX к сформированным филаментам RecA приводит к увеличению числа неактивных состояний в структуре филамента, что может вести к уменьшению наблюдаемой скорости гидролиза АТФ и ингибированию активности филамента.

© А. А. Алексеев, Е. А. Знобищева, Г. Е. Побегалов, А. П. Якимов, Д. М. Байтин, М. А. Ходорковский, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 19-74-10049.

Полученные данные существенно расширяют представления о регуляции нуклеопротеиновых филаментов RecA белком RecX. Понимание механизмов ингибирования активности RecA представляет ценность для разработки лекарственных препаратов, направленных на предотвращение адаптации бактерий к антибиотикам.

Литература

1. Lusetti S. L., Cox M. M. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks // Annual review of biochemistry. 2002. Vol. 71, P. 71–100.

2. Jasin M., Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013. Vol. 5. P. a012740.

3. Le S., Serrano E., Kawamura R., Carrasco B., Yan J., Alonso J. C. Bacillus subtilis RecA with DprA–SsbA antagonizes RecX function during natural transformation // Nucleic acids research. 2017. Vol. 45. P. 8873–8885.

4. Drees J. C., Lusetti S. L., Cox M. M. Inhibition of RecA protein by the Escherichia coli RecX protein: modulation by the RecA C terminus and filament functional state // Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279. P. 52991–52997.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ*

Ю. Г. Бирулина[1], Е. Е. Буйко[1], А. В. Григорьева[1], Р. Р. Шайбекова[1], О. А. Трубачева[2]

[1] *Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск*
[2] *НИИ кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН*

E-mail: birulina20@yandex.ru

Аннотация

Выполнено моделирование метаболического синдрома на крысах. Установлено, что при метаболическом синдроме амплитуда гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов, обусловленного проводимостью Gardos-каналов, изменялась разнонаправленно в зависимости от активирующего фактора. Содержание животных на высокожировой и высокоуглеводной диете приводило к усилению коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов.

В настоящее время подтверждено, что при метаболическом синдроме (МС) со стороны системы крови развиваются различные патологические процессы, занимающие важное место в патогенезе кардиоваскулярных заболеваний. В возникновение последних вносят вклад структурно-функциональные нарушения эритроцитов и тромбоцитов. Целью исследования являлось изучение проводимости Ca^{2+}-зависимых калиевых каналов (Gardos-каналов) мембраны эритроцитов и агрегации тромбоцитов крыс при МС.

В качестве объекта исследования использовали крыс-самцов линии Wistar, которых разделили на контрольную и опытную группы (по 12 животных в каждой). Крыс контрольной группы содержали на стандартной диете. Крысы опытной группы в течение 12 недель находились на высокожировой и высокоуглеводной диете, содержащей корм с добавлением животного жира (17 %), фруктозы (17 %), холестерина (0,25 %), с заменой питьевой воды на 20%-й раствор фруктозы. Для контроля развития МС у животных два раза в месяц измеряли АД и фиксировали вес. На 12-й неделе исследования выполняли глюкозотолерантный тест. Животных подвергали эвтаназии методом CO_2-асфиксии. Кровь из сердца отбирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтами: K_2 ЭДТА (для оценки гематологических и биохимических параметров), лития гепарин (для исследования активности Gardos-каналов), цитрат натрия (для изучения агрегации тромбоцитов). Гематологические и биохимические показатели оценивали при помощи автоматических анализаторов. Для исследования проводимости Gardos-каналов определяли амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО) суспензии эритроцитов в ответ на добавление 0,5 мкМ Ca^{2+}-ионофора А23187 или системы аскорбат (10 мМ) — феназинметосульфат (ФМС, 0,1 мМ). Агрегационную способность тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали коллаген (2 мкг/мл).

Содержание животных на высокожировой, высокоуглеводной диете приводило к ожирению, повышению артериального давления, гипергликемии, снижению толерантности к глюкозе, дислипидемии с выраженной триглицеридемией. У крыс экспериментальной группы происходило увеличение количества лейкоцитов в 1,5 раза ($p < 0,05$), главным образом за счет гранулоцитов. В то же время у животных, получающих высокожировой и высокоуглеводный рацион, наблюдалось увеличение содержания в крови тромбоцитов в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. У животных опытной группы отмечалось увеличение степени и скорости агрегации тромбоцитов, вызванной коллагеном. У экспериментальных крыс амплитуда ГО эритроцитов, стимулированного Ca^{2+}-ионофором А23187, снижалась по сравнению с данными животных контрольной группы. Амплитуда ГО, полученного при добавлении к суспензии эритроцитов искусственной электронно-донорной системы аскорбат — ФМС, напротив, повышалась у крыс экспериментальной группы. Полученные результаты свидетельствуют о развитии и прогрессировании метаболических и сопряженных с ними гемореологических нарушений при МС.

© Ю. Г. Бирулина, Е. Е. Буйко, А. В. Григорьева, Р. Р. Шайбекова, О. А. Трубачева, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-143.2020.4).

ОЦЕНКА ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КУКУБИТУРИЛОВ И ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ*

О. С. Боева[1,2], А. А. Актанова[2], Е. А. Пашкина[2]

[1]Новосибирский государственный университет
[2]НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

E-mail: o.boeva@g.nsu.ru

Аннотация

В работе исследовалась гемолитическая активность перспективных систем доставки лекарств: кукурбит[n]урилов (КБ) и глицирризиновой кислоты (ГК). Авторами показано, что культивирование эритроцитов с КБ и ГК в присутствии аутологичной сыворотки не вызывает гемолитического эффекта. Полученные данные представляют интерес для дальнейшей разработки лекарственных препаратов на основе систем доставки лекарств.

Исследование токсичности систем доставки лекарственных препаратов, в особенности исследование гематотоксичности, является наиболее важным направлением в области современной онкоиммунологии. В работе оценивалась гематотоксичность кукурбит[n]урилов (n = 6, 7 и 8) — макроциклических кавитандов, содержащих мономеры гликолурила(n), связанных метиленовыми мостиками, и глицирризиновой кислоты, которая является тритерпеноидным гликозидом, дающим при гидролизе глицирретовую кислоту и две молекулы глюкуроновой кислоты.

В данной работе оценивалась гематотоксичность КБ (n = 6, 7 и 8) и глицирризиновой кислоты. 2 % суспензия эритроцитов восьми условно здоровых доноров, которая обрабатывалась растворами КБ[6] и КБ[7] в концентрациях 0,2, 0,5, 1 и 2 мМ, КБ[8] (0,01 мМ), в фосфатно-солевом буфере (PBS), в растворе альбумина (40 г/л) и в аутологичной сыворотке крови донора. ГК — 1 мг, 100 мкг, 10 мкг, 1 мкг, 0,1 мкг, 0,01 мкг. В качестве отрицательного контроля использовалась суспензия без добавления растворов КБ и ГК, а в качестве положительного контроля — 10%-й р-р Triton X-100. Образцы инкубировались 60 минут при 37 °С. Оценка уровня свободного гемоглобина проводилась спектрофотометрически. Статистическая обработка производилась с использованием критерия Манна — Уитни, различия достоверны при $p < 0,05$.

В результате ГК и КБ[6] и КБ[8] не обладают гемолитической активностью. Однако КБ[7] проявляет различные свойства. В сыворотке крови гемолиза не наблюдалось. Однако эритроциты, культивированные с КБ[7] в концентрации 2 мМ в PBS и в концентрациях 0,2, 0,5, 1 и 2 мМ в альбумине, подверглись гемолизу.

Следовательно, мы можем предполагать, что КБ[n] и ГК практически не имеют гемолитической активности. Однако КБ[7] проявляют гематотоксические свойства в сложных биологических средах, близких к физиологическим условиям. Возможно, гемолиз с альбумином связан не столько с токсическим действием самих кукурбитурилов, сколько с непрямым взаимодействием КБ[n] с компонентами среды. Мы полагаем, что усиление гемолиза в присутствии КБ[7] требует дальнейшего изучения.

© О. С. Боева, А. А. Актанова, Е. А. Пашкина, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-70039 «Стабильность».

ИНГАЛЯЦИОННОЕ ВВЕДЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА ЦЕФАЗОЛИНА: ФАРМАКОКИНЕТИКА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ

С. В. Валиулин[1], А. А. Онищук[1], С. В. Аньков[1,2], А. М. Бакланов[1], С. Н. Дубцов[1], Т. Г. Толстикова[1,2], Н. Н. Шкиль[3]

[1]*Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*
[2]*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[3]*Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, п. Краснообск*

E-mail: valiulin@kinetics.nsc.ru

Аннотация

Разработан метод ингаляционной доставки аэрозоля цефазолина, антибактериального лекарственного вещества первого поколения цефалоспоринового ряда. Проведено исследование фармакокинетики цефазолина после его ингаляционного введения в сравнении с традиционными инъекционными методами доставки этого вещества. Показана превосходная эффективность ингаляционного способа введения при лечении бактериального сепсиса, вызванного бактериями *Klebsiella pneumonia*, у лабораторных мышей.

По данным Всемирной организации здравоохранения, инфекции нижних дыхательных путей входят в десятку основных причин смерти в мире. Это обусловлено, в частности, развитием бактериальной устойчивости к применяемым антибактериальным средствам. В связи с этим в последнее десятилетие особое внимание уделяется развитию методов лечения инфекций, устойчивых к лекарственным средствам. Антибактериальные средства в ингаляционной форме смогут доставлять активные вещества непосредственно в пораженный орган (легкие), при этом создавая их высокие концентрации в нем. Благодаря этому возможно повысить эффективность терапии.

В настоящей работе проведено исследование аэрозольной доставки цефазолина, антибактериального вещества I поколения, цефалоспориновго ряда. Для этого был разработан и создан ингаляционный стенд, включающий в себя: генератор сухих аэрозольных частиц, принцип действия которого основан на ультразвуковом распылении раствора исследуемого вещества, ингаляционные камеры типов nose-only и whole-body, измерительное оборудование (спектрометр аэрозоля диффузионный ДСА-М и оптический спектрометр аэрозоля ОСА, позволяющие определять доставляемую лабораторным животным дозу в режиме реального времени). Концентрацию цефазолина в крови и органах лабораторных мышей определяли методом ВЭЖХ.

Для сопоставления эффективности ингаляционного метода с другими методами введения были выполнены исследования фармакокинетики цефазолина после внутривенного и внутрибрюшинного введения. Показано, что ингаляция аэрозоля со средним размером частиц 1 мкм, позволяет достичь концентрации цефазолина в легких на порядок больше, чем при его внутривенном и внутрибрюшинном введении (при одинаковых доставляемых дозах). А за счет накопления вещества в легких с последующим его постепенным проникновением в системный кровоток концентрация цефазолина в крови сохраняется примерно на одном — максимальном — уровне в течение не менее 20 минут. Этого не удается достичь при внутривенном и внутрибрюшинном введениях. Биодоступность при ингаляционном введении составила 85 %.

Антибактериальная эффективность ингаляционной формы цефазолина в сравнении с внутрибрюшинным введением была исследована на модели сепсиса, вызванного бактериями *Klebsiella pneumoniae*, у лабораторных мышей. Доставляемая аэрозольная доза составила 1,7 мг/кг, внутрибрюшинная — 4 мг/кг. Аэрозольная форма продемонстрировала превосходный лечебный антибактериальный эффект. Мыши, инфицированные 0,5 мл суспензии бактерий с концентрацией 10^6 КОЕ/мл, не получавшие лечение, а также те, которых лечили внутрибрюшинным введением препарата, погибли в течение первых суток. В то же время мыши, подвергнутые ингаляционному лечению цефазолином, оставались живы весь период наблюдения — 7 суток. Через 8 часов после инфицирования у животных, получавших лечение ингаляционно, количество КОЕ бактерий в крови оказалась на порядок меньше, чем у животных, не получавших цефазолин.

© С. В. Валиулин, А. А. Онищук, С. В. Аньков, А. М. Бакланов, С. Н. Дубцов, Т. Г. Толстикова, Н. Н. Шкиль, 2021

НАРУШЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ПРИЧИНЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ*

В. А. Вигонт, Д. А. Грехнев, Е. В. Казначеева

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E-mail: Vvigand@gmail.com

Аннотация

В работе исследованы нарушения кальциевой сигнализации в пациент-специфичных моделях полиглутаминовых нейродегенеративных патологий, таких как болезнь Хантингтона и спиноцеребеллярные атаксии 1 и 17 типов. Показаны различные паттерны нарушений притока кальция через потенциал-управляемые и депо-управляемые каналы, что может являться одной из причин появления феномена селективной уязвимости нейронов при данных заболеваниях.

Феномен селективной гибели нейронов при различных нейродегенеративных заболеваниях является одной из наиболее интригующих проблем современной нейробиологии. К механизмам, которые могут лежать в его основе, на данный момент относят: разницу в накоплении нерастворимых агрегатов мутантных белков, особенности протеостаза, дифференциальную экспрессию генов, отличия в субъединичном составе рецепторов нейротрансмиттеров, особенности дисфункции митохондрий и, наконец, отличия в нарушениях кальциевого гомеостаза. Причем дисрегуляция кальциевой сигнализации может сопровождать большинство вышеперечисленных механизмов.

Нарушения кальциевой сигнализации были отмечены для множества нейродегенеративных патологий. В частности, были выявлены нарушения в работе кальциевых каналов, в том числе потенциал-управляемых, лиганд-управляемых и каналов, обеспечивающих депо-управляемый вход кальция (SOCE), что позволяет рассматривать пути притока кальция в нейроны как перспективные мишени для проведения генетической и фармакологической коррекции нейродегенеративных заболеваний.

Благодаря развитию технологий генетического репрограммирования появилась возможность изучения высокофизиологичных, пациент-специфичных моделей нейродегенеративных патологий. В наших исследованиях мы использовали терминально дифференцированные ГАМК-эргические нейроны стриатума, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, специфичных для конкретных пациентов с клинически подтвержденными диагнозами таких патологий, как болезнь Хантингтона (БХ) и спиноцеребеллярные атаксии 1 (СЦА1) и 17 (СЦА17) типов.

С помощью электрофизиологических и флуоресцентных методов мы показали, что вход кальция через потенциал-управляемые и депо-управляемые каналы значительно увеличен в нейронах стриатума, моделирующих БХ и СЦА17, в то время как для СЦА1 вход кальция через потенциал-управляемые каналы оставался неизменным, а через депо-управляемые каналы оказался немного сниженным. Данные паттерны нарушений коррелируют с уязвимостью нейронов стриатума при изучаемых патологиях. Так, для СЦА17 гибель ГАМК-эргических нейронов стриатума является весьма характерной, для БХ эти нейроны вообще являются наиболее уязвимыми, в то время как при СЦА1 их гибель практически не наблюдается.

Полученные данные позволяют рассматривать нарушения кальциевого гомеостаза как одну из причин избирательной гибели нейронов при различных нейродегенеративных заболеваниях и должны стать важным этапом на пути к разработке высокоселективных подходов к их терапии.

© В. А. Вигонт, Д. А. Грехнев, Е. В. Казначеев, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта Минобрнауки РФ № 075-15-2020-795 (Соглашение 13.1902.21.0027) и КНВШ Санкт-Петербурга.

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

М. В. Волкова, В. В. Бояринцев, А. В. Трофименко, Г. И. Фильков, М. О. Дурыманов

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

E-mail: biotech.volkova@list.ru

Аннотация

Изучено влияние культивирования мезенхимальных стволовых клеток в условиях физиологической гипоксии на жизнеспособность и образование активных форм кислорода при окислительном стрессе. Установлено, что при слабом окислительном стрессе клетки, выращенные в условиях гипоксии, накапливают больше активных форм кислорода, что снижает их жизнеспособность по сравнению с клетками, выращенными в стандартных условиях культивирования.

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) широко используются в терапии различных заболеваний. При этом основным терапевтическим влиянием ММСК является секреция хемокинов, цитокинов и факторов роста. Одним из способов повышения секреции биомолекул и увеличения жизнеспособности клеток является культивирование в гипоксии. Несмотря на это, терапия на основе ММСК имеет серьезное ограничение, связанное с гибелью более 90 % трансплантируемых клеток в результате окислительного стресса вне зависимости от условий культивирования. Целью работы является изучение влияния гипоксии на жизнеспособность и образование активных форм кислорода (АФК) при окислительном стрессе.

Для проведения исследований использовались ММСК человека, имеющие соответствующий фенотипический профиль и способные дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. Клетки культивировали в условиях нормоксии (ММСК-N, 21 % O_2, 5 % CO_2, S-Bt Smart BioTerm, Biosan, Латвия) и гипоксии (ММСК-Н, 5 % O_2, 5 % CO_2, CB-150, Binder, Германия). Эксперименты проводили на монослое клеток. Для создания условий окислительного стресса использовали трет-бутилпероксид водорода (tBHP, Sigma-Aldrich, США), который добавляли в питательную среду на основе DMEM/F12 (Gibco, США). Клетки инкубировали в течение 24 часов. Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания метиленовым синим, количество белка определяли с помощью набора BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Германия). Количество АФК исследовали с использованием дихлорфлуоресцеина диацетата (Sigma-Aldrich, США). Все измерения проводили с использованием планшетного ридера CLARIOStar Plus (BMG LABTECH, Германия).

Установлено, что жизнеспособность ММСК-Н начинает снижаться при концентрации 200 мкМ tBHP, в то время как жизнеспособность клеток ММСК-N падает при концентрациях выше 800 мкМ tBHP. Кроме того, в условиях окислительного стресса отмечено повышение синтеза белка клетками, выращенными в нормоксии; гипоксическая культура синтез белка не увеличивает. В результате при оценке уровня активных форм кислорода обнаружено следующее: ММСК-N демонстрирует снижение уровня АФК на количество белка при окислительном стрессе, при этом соотношение АФК к проценту живых клеток начинает возрастать при концентрации 1 000 мкМ tBHP. ММСК-Н демонстрирует обратную зависимость: уровень АФК к количеству белка при окислительном стрессе сохраняется по сравнению с контролем, но соотношение АФК к проценту живых клеток резко возрастает в 3 раза при концентрации 200 мкМ tBHP.

Таким образом, установлено, что культивирование в гипоксии снижает жизнеспособность ММСК при слабом окислительном стрессе (менее 1 000 мкМ tBHP) по сравнению с клетками, выращенными в нормоксии. При сильном окислительном стрессе (более 1 000 мкМ tBHP) влияния условий культивирования не выявлено.

© М. В. Волкова, В. В. Бояринцев, А. В. Трофименко, Г. И. Фильков, М. О. Дурыманов, 2021

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТА В ПРОЦЕССЕ ВЕЗИКУЛЯРИЗАЦИИ

А. В. Гисич[1,2], Е. С. Ястребова[1,3], Д. И. Строкотов[1,4]

[1]*Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*
[2]*Новосибирский государственный университет*
[3]*Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина*
[4]*Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России*

E-mail: a.gisich@g.nsu.ru

Аннотация

Популяция эритроцитов постоянно меняется. Около 2 миллионов клеток поступают в кровоток из костного мозга типичного здорового взрослого человека каждую секунду, и примерно такое же количество клеток выводится организмом из кровотока. Типичный эритроцит циркулирует в течение 100–120 дней, затем перерабатывается и заменяется. Многие характеристики меняются в течение жизни эритроцитов в периферическом кровообращении: объем и масса гемоглобина уменьшаются примерно на 20 и 15 % соответственно, площадь поверхности уменьшается, отношение поверхности к объему увеличивается. Известно, что данные изменения происходят главным образом за счет везикуляризации. Однако некоторые исследования утверждают, что везикуляризация не может учитывать весь объем и потерю гемоглобина эритроцитами, поскольку сумма потерянного объема или массы гемоглобина в пузырьках значительно меньше, чем потеря клетками. Также было подсчитано, что в эритроците в целом недостаточно мембраны, чтобы упаковать 20 % гемоглобина в виде пузырьков.

К сожалению, на данный момент не существует точного описания изменения формы эритроцита в процессе старения с учетом размера отщепляемых везикул, а также понимания того, имеет ли скорость везикуляризации зависимость от возраста эритроцита.

Таким образом, целью данной работы являлся поиск оптимальной модели изменения формы эритроцита в процессе старения. Для этого были проведены расчеты параметров эритроцита при везикуляризации, основанные на оптической модели, с учетом вариации размеров отщепляемых везикул и начальных параметров эритроцита (объем и индекс сферичности). Установлено изменение скорости везикуляризации, приводящее к наблюдаемым в эксперименте изменениям формы эритроцита и концентрации гемоглобина с течением жизненного цикла клетки.

В результате моделирования представляется возможным построить зависимости индекса сферичности, объема и площади поверхности от времени циркуляции эритроцита в кровотоке, что в дальнейшем помогает судить о законе изменения везикуляризации в процессе старения и обнаружения патологий.

© А. В. Гисич, Е. С. Ястребова, Д. И. Строкотов, 2021

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СКОРОСТИ СДВИГА НА АГРЕГАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

В. П. Демкин[1], Т. В. Руденко[1], А. А. Жуковская[1], Л. Ю. Котловская[2], В. В. Удут[1,2]

[1] Томский государственный университет
[2] НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

E-mail: nastya120498z@mail.ru

Аннотация

Математическое моделирование процессов гемокоагуляции позволит дополнить фундаментальные данные о характере изменений вязкоупругих характеристик крови при образовании тромба и о механизмах изменения гемостатического потенциала при различных патологических состояниях организма.

Своевременная диагностика тромбоопасности на сегодняшний день является чрезвычайно важным аспектом профилактики развития тромбогеморрагических осложнений (ТГО), которые, по результатам современных статистических данных, являются одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения. Наблюдаемое в течение длительного периода времени снижение уровня смертности в результате манифестации ТГО на сегодняшний день сменилось ростом: с 573,2 (2019 г.) до 640,8 на 100 тыс. (2020 г.) [1]. Ввиду этого актуальной представляется разработка новых методов исследования реологии крови в условиях патологического состояния организма, основанная на характеристиках клеточного и коагуляционного звеньев гемостаза и математическом моделировании. Это позволит дополнить фундаментальные данные о механизмах изменения гемостатического потенциала и нюансах изменений вязкоупругих характеристик крови в тромбогенезе.

Цельная кровь хорошо описывается в рамках реологической модели как жидкость, обладающая упругими и вязкостными свойствами. Основным реологическим уравнением для таких жидкостей является $\tau = \eta \dot{\gamma}$, где τ — тензор касательных напряжений, $\dot{\gamma}$ — скорость сдвиговой деформации; η — вязкость. При низких скоростях сдвига пространственная структура эритроцитов не разрушается и обусловливает пороговое поведение сдвиговой деформации, при которой проявляются пластические свойства крови. При высоких скоростях > 200 с-1 происходит разрушение пространственной структуры эритроцитов, что вызывает эффект сдвигового разжижения крови, а это приводит к уменьшению вязкости [2].

В данной работе был исследован характер изменения вязкости крови при изменении скорости сдвига. С помощью математической модели пьезоэлектрического датчика было доказано, что эти характеристики связаны между собой нелинейной зависимостью.

Кровь — это неньютоновская жидкость, она становится более жидкой по мере того, как сдвигающие силы генерируют увеличение потока. Это обратимое изменение, и вязкость крови увеличивается по мере уменьшения сил сдвига. При заданном напряжении сдвига вязкость крови определяется величиной гематокрита, вязкостью плазмы и реологическими свойствами эритроцитов. Двумя особыми свойствами эритроцитов, лежащими в основе неньютоновского реологического поведения, являются деформируемость и агрегация. Для измерения вязкоупругих характеристик цельной крови использовался пьезотромбоэластограф АРП–01М «Меднорд», регистрирующий изменения сопротивления исследуемой жидкости резонансным колебаниям иглы-резонатора пьезоэлектрического датчика.

Неньютоновское поведение крови в реальных потоках сильно отличается от соответствующего поведения в установившемся потоке. Поэтому при моделировании гемодинамики, зависящей от времени, необходимо учитывать реологическую модель, максимально соответствующую реальным клиническим условиям.

Литература

1. Смертность от болезней системы кровообращения (на 100 тыс. населения) [Электронный ресурс] // Росстат. ЕМИСС. Государственная статистика. URL: https://www.fedstat.ru/indicator/55382 (дата обращения: 30.08.2021).

2. Демкин В. П., Мельничук С. В., Удут В. В., Тютрин И. И., Руденко Т. В., Криницына Д. Б. Определение вязкоупругих характеристик цельной крови на основе метода низкочастотной пьезотромбоэластографии // Известия высших учебных заведений. Физика, 2019. Т. 62. № 12. С. 55–62.

© В. П. Демкин, Т. В. Руденко, А. А. Жуковская, Л. Ю. Котловская, В. В. Удут, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПОЗДНИХ СТАДИЙ ИНФИЦИРОВАНИЯ ОБОЛОЧЕЧНЫМИ ВИРУСАМИ*

З. Г. Дениева, О. В. Батищев

Институт физический химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина, Москва

E-mail: zaret03@mail.ru

Аннотация

Вирусы представляют большую угрозу для всего живого мира. Оболочечные вирусы, в число которых входят такие представители, как вирус гриппа, ВИЧ, вирус Эбола, SARS-CoV-2 и многие другие, способны вызывать как сезонные эпидемии, так и мировые пандемии. Структура и жизненный цикл всех этих вирусов имеют общие черты. Одними из основных компонентов вирусной частицы являются их матриксные белки, которые играют важную роль в процессе инфицирования клетки. Используя модельные системы липидных нанотрубок, мы исследовали кинетику адсорбции матриксного белка M1 вируса гриппа А и полипротеина Gag ВИЧ-1 на липидных мембранах для выявления физико-химических механизмов их действия.

В жизненном цикле вируса этап формирования дочерних вирионов в инфицированной клетке является одним из ключевых. Особую роль в этом процессе играют матриксные белки — наиболее консервативные компоненты оболочечных вирусов. Взаимодействуя с плазматической мембраной, они обеспечивают условия для сборки и отпочковывания новых вирусных частиц с поверхности клетки. Однако механизм формирования ими искривленных участков мембраны для выхода вирусной частицы не до конца ясен.

В данной работе мы использовали модельную систему липидных нанотрубок, вытянутых из плоских бислойных липидных мембран (БЛМ) и гигантских униламеллярных везикул (ГУВ). Особенность данных систем заключается в том, что радиус таких трубок напрямую зависит от механических параметров липидного бислоя. Основываясь на этом свойстве и ряде контрольных экспериментов, нами был предложен общий физико-химический механизм формирования искривленных участков липидных мембран под воздействием различных вирусных белков.

Важным моментом в исследовании было определение индивидуальных условий, необходимых для процесса сборки и почкования. Так, для матриксного белка M1 вируса гриппа А триггером является перепад значений pH между кислым и нейтральным, а для полипротеина Gag вируса иммунодефицита (ВИЧ-1) — наличие в мембране заряженных липидов, в особенности фосфатидилинозитол 4,5-бифосфата (PIP2).

© З. Г. Дениева, О. В. Батищев, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 20-54-14006.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

Е. А. Добрынина[1], К. А. Окотруб[1], С. В. Адищев[1], М. В. Кручинина[2], В. Н. Кручинин[3], С. В. Суровцев[1]

[1]*Институт автоматики и электрометрии СО РАН, Новосибирск*
[2]*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[3]*Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова СО РАН, Новосибирск*

E-mail: e.dobrynina@g.nsu.ru

Аннотация

Мембраны эритроцитов крови претерпевают изменения при воздействии болезней на организм человека. Анализ состава мембран может быть осуществлен с применением спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС). Однако существует мешающий анализу спектров КРС фактор, связанный с рассеянием света от гемоглобина. Основной задачей работы является адаптация методики КРС для получения спектров от мембран эритроцитов; также исследуется эффективность разных методик выделения мембран эритроцитов из крови методом Доджа, методом погружения в жидкий азот и их комбинацией. В спектрах КРС мембран наблюдаются наиболее интенсивные линии, относящиеся к вкладу липидов, а также наблюдается дисперсия по концентрации и насыщению гемоглобина. Сравнение разных протоколов выделения мембран показало, что метод погружения в жидкий азот позволяет получать образцы с остаточной концентрацией гемоглобина, не превышающей содержание гемоглобина в образцах, полученных методом Доджа и их комбинацией.

Кровь циркулирует в системе кровеносных сосудов, переносит питательные вещества и кислород к тканям. Однако при ряде болезней может происходить изменение свойств и состава мембран эритроцитов крови [1, 2]. Поэтому развитие методов характеризации элементов крови актуально в настоящее время. Анализ состава мембран эритроцитов крови может быть осуществлен с применением спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС). Это бесконтактная, неразрушающая экспериментальная методика, которая позволяет характеризовать состав и фазовое состояние мембран. Получение спектров КРС мембран эритроцитов является сложной задачей, поскольку существует мешающий анализу спектров фактор, связанный с рассеянием света от гемоглобина.

Стандартным методом выделения мембран эритроцитов из крови человека является метод Доджа [3], основанный на осмотическом лизисе клеток. В практике встречается заморозка суспензии мембран в жидком азоте для дополнительной очистки. Основной задачей работы является адаптация методики КРС для выделения спектров от мембран эритроцитов без гемоглобина. В настоящей работе мы исследуем эффективность разных методик выделения мембран эритроцитов: (i) метод Доджа, (ii) метод Доджа в комбинации с погружением образцов в жидкий азот; (iii) исключительно методом заморозки в жидком азоте.

Визуально практически все образцы были белого — светло-желтого цвета, что является распространенным критерием выделения мембран. В измеренных спектрах КРС наблюдаются наиболее интенсивные линии, относящиеся к вкладу липидов. При этом в спектрах присутствует вклад резонансного КРС гемоглобина, указывающий на то, что полностью отделить мембраны от гемоглобина не удалось. В образцах, изученных методом КРС, наблюдается широкая дисперсия по концентрации и насыщению гемоглобина кислородом. Выдвинуто предположение, что эта дисперсия связана со сгустками эритромассы в исходной кровяной суспензии. Сравнение разных протоколов выделения мембран показало, что метод заморозки суспензии в жидком азоте позволяет получать образцы с остаточной концентрацией гемоглобина, не превышающей содержание гемоглобина в образцах, полученных методом Доджа (i) и комбинированным подходом (ii). Для дальнейшего улучшения протоколов выделения мембран предлагается использование гепарина, препятствующего свертыванию крови.

Литература

1. Lin J. et al. Erythrocyte membrane analysis for type II diabetes detection using Raman spectroscopy in high-wavenumber region // Applied Physics Letters. 2014. Vol. 104. No. 10. P. 104102.

2. Kubánková M. et al. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19 //Biophysical Journal. 2021.

3. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes //Archives of biochemistry and biophysics. 1963. Vol. 100. No. 1. P. 119–130.

© Е. А. Добрынина, К. А. Окотруб, С. В. Адищев, М. В. Кручинина, В. Н. Кручинин, С. В. Суровцев, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ МНОГОСЛОЙНЫХ ВЕЗИКУЛ ЛИПИДНЫХ СМЕСЕЙ МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА *

Ю. В. Зайцева, Н. В. Суровцев

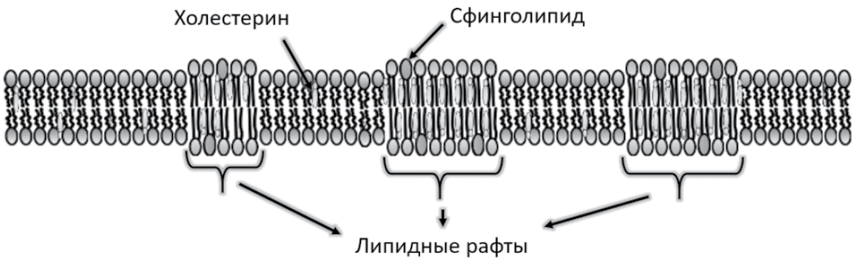
Институт автоматики и электрометрии СО РАН, Новосибирск

E-mail: julmari3@mail.ru

Аннотация

Исследованы спектры комбинационного рассеяния света (КРС) многослойных везикул дейтерированного фосфолипида DPPC-d62 и его смесей с DPPC, DOPC и холестерином. Отработан подход к анализу смесей дейтерированного и протонированного липидов, позволяющий независимо определять фазовое состояние отдельных компонентов по спектрам КРС.

Фосфолипиды и другие компоненты клеточной мембраны распределены по ней неоднородно, в мембране могут образовываться области, отличающиеся по составу и по фазовому состоянию липидов (см. рисунок). Неоднородности мембраны (липидные рафты) вовлечены во многие клеточные процессы. Один из подходов, использующихся для понимания механизма образования липидных рафтов, является исследование модельных систем: например, везикул, сформированных смесями из двух и более фосфолипидов или других липидных компонентов, в которых возможно фазовое разделение.



Схематичное изображение неоднородностей клеточной мембраны (липидные рафты)

Метод комбинационного рассеяния света часто применяется для исследования фазового состояния липидного бислоя. Однако в спектрах КРС липидных смесей линии колебаний отдельных компонентов лежат на одних и тех же частотах, что затрудняет анализ. Возможным решением является замена одного из компонентов его дейтерированным аналогом. Линии молекулярных колебаний дейтерированных молекул смещены в область более низких частот, что может позволить независимо анализировать состояние отдельных компонентов смеси. Однако спектры дейтерированных фосфолипидов исследованы не так хорошо, как протонированных. Поэтому актуальной задачей является уточнение интерпретации линий в спектре КРС дейтерированных липидов и исследование чувствительности линий к фазовому состоянию бислоя при изменении температуры или липидного состава.

В данной работе показано, что линия, соответствующая C–C all-trans колебаниям, для спектров КРС дейтерированных фосфолипидов смещается на частоту ~985 $см^{-1}$, интегральная интенсивность этой линии отображает число гидрофобных хвостов липида в all-trans конформации. Исследовано поведение этой линии в температурном диапазоне от 100 К до 320 К.

Линия антисимметричных CH_2 колебаний в спектрах протонированных липидов на частоте ~2 880 $см^{-1}$ имеет высокую интенсивность и чувствительна к фазовому состоянию бислоя. Именно эта линия чаще всего анализируется при исследовании фосфолипидов методом КРС, однако природа такой высокой интенсивности рассеяния на частоте ~2 880 $см^{-1}$ все еще не до конца ясна. В данной работе показано, что линия антисимметричных CH_2 колебаний чувствительна к изотопному замещению. Вклады в интенсивность линии от конформационной упорядоченности липидных хвостов и от окружения липидной молекулы не складываются, как принято считать, а перемножаются. Такой вывод можно сделать из анализа температурных зависимостей интенсивности этой ли-

© Ю. В. Зайцева, Н. В. Суровцев, 2021

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-12-00127.

нии для нескольких смесей с различными соотношениями протонированного липида DPPC и его дейтерированного аналога DPPC-d62.

Смесь DPPC-D62 с DOPC и холестерином является одной из простейших моделей клеточной мембраны, в которой возможно фазовое разделение и сосуществование нескольких фаз. Анализ линий C–C all-trans колебаний и CH_2 twist колебаний протонированного липида показал, что при комнатной температуре DOPC остается в разупорядоченном состоянии для любого соотношения компонентов смеси. Анализ линий C–C all-trans колебаний и симметричных CD_2 колебаний дейтерированного липида показал, что при добавлении DOPC и холестерина происходит разупорядочение молекул DPPC-d62. На основе этих данных были построены тройные диаграммы, отображающие фазовое состояние бислоя для различных соотношений компонентов липидной смеси.

LASER ACTIVATION OF MOLECULAR SENSITIZERS FOR THE CONTROL OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN SOLUTIONS*

A. T. Ishemgulov, S. N. Letuta

Orenburg State University

E-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru

Abstract

Mechanisms of inactivation of gram-negative bacteria (Escherichia coli and Salmonella typhimurium) by laser pulses in solutions with molecular sensitizers (erythrosine and rhodamine) are discussed in this paper. Photodynamic and thermal mechanisms of bacterial damage are considered depending on the degree of interaction between the sensitizer and cell wall.

Photoinactivation of microorganisms is one of the most promising anti-bacterial methods, which is alternative to traditional antibiotics. The method includes exposing the microorganisms to light radiation in the presence of sensitizers. Sensitizers are compounds that absorb light energy and convert it into the forms that cause cell death. Certain successes have been achieved in inactivating gram-positive bacteria. However, gram-negative bacteria have significantly greater light resistance. In this work, we investigated the mechanisms of photoinactivation of planktonic bacterial cultures of gram-negative *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (concentration ca. 10^8 CFU per ml) by short laser pulses (15 ns) in solutions with molecular sensitizers (xanthene dyes erythrosine and rhodamine C, concentration ca. 10^{-4} M).

Bacterial outer membrane includes lipopolysaccharides; it leads to the negative charge of the cell wall. Erythrosine in solution is an anion, and rhodamine is a cation. The erythrosin absorption and emission spectra almost have not changed at either absence or presence of bacteria in the solution. But rhodamine luminescence was quenched at presence of bacterial cells. This indicates that in our experiment rhodamine molecules bind to the bacteria cell, but erythrosine does not. After bounding, rhodamine compensates for the negative charge on the cell wall, and bacterial cooperative effect is enhanced. The results obtained by the microscopy and the dynamic light scattering show that in rhodamine solutions, in comparison with unstained solutions, significally bigger groups of bacteria are observed and there are almost no single cells.

After irradiation of solutions, the cell viability was assessed by CFU counting. Both dyes demonstrated quite good results in inactivating bacteria, but rhodamine showed better antibacterial effect. Two groups of damage mechanisms can be distinguished:

– Both dyes after light absorption, as a result of non-radiative relaxation, can give a rapid heat production. Heat is released either in the form of cell hyperthermia or in the form of shock waves. Shock waves are generated as a result of ultrafast heating of the solution with further formation and collapse of vapor bubbles [1].

– Classic photodynamic mechanism is possible for erythrosine. It has a high yield to the triplet excited state and can generate reactive oxygen species.

Despite the fact that rhodamine acts only via a thermal mechanism, the proximity of antibacterial agent to its target is important. Erythrosine can only act through shock waves or photodynamic products. The obtained results can prove useful in the development of new strategies for the control of microorganisms.

References

1. Letuta S. N. et al. Inactivation of Planktonic Microorganisms by Acoustic Shock Waves // Russ. J. Phys. Chem. 2021. Vol. 95, P. 848–854.

© A. T. Ishemgulov, S. N. Letuta, 2021

* This study was supported by the RF Ministry of Education; project FSGU-2020-0003.

ЛАБОРАТОРИЯ НА МИШЕНИ ДЛЯ СПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ АДДУКТОВ БЕЛКОВ КРОВИ С ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИМИ КСЕНОБИОТИКАМИ

Я. К. Калниня[1], Е. П. Подольская[2]

[1] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
[2] Научно-клинический центр токсикологии им. С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург

E-mail: kln.yana.k@gmail.com

Аннотация

Разработанный алгоритм концентрирования аддуктов из биологического образца методом металл-аффинной хроматографии (МАХ) непосредственно на поверхности МАЛДИ-мишени может позволить ретроспективно диагностировать интоксикацию галогенсодержащими алкилирующими агентами по аддуктам белков крови с этими агентами и/или их метаболитами.

Алкилирующие хлорсодержащие агенты обладают тератогенными и мутагенными действиями. Токсичные вещества, относящиеся к данному классу, могут использоваться в качестве промышленных реагентов, выделяться в окружающую среду в результате разложения промышленных и бытовых отходов, а также могут образовываться в результате метаболизма ряда лекарственных препаратов. Известно, что многие из них способны образовывать ковалентные аддукты с макромолекулами, в первую очередь с белками, что также может являться вероятной причиной токсических эффектов. При этом на сегодняшний день практически не исследована возможность специфичной экстракции из биологических образцов аддуктов белков с хлорсодержащими соединениями методом МАХ.

Нами предложен новый подход для специфичной экстракции аддуктов белков с хлорсодержащими соединениями (лаборатория на мишени), включающий следующие стадии: формирование слоя сорбента непосредственно на ячейке МАЛДИ-мишени; нанесение образца (триптический гидролизат белка); пробоподготовка (сорбция, промывка, нанесение матрицы); МАЛДИ-МС анализ (детектирование аддуктов); МАЛДИ-МС-МС анализ (идентификация аддуктов).

Процедура формирования металл-аффинных сорбентов на подложке основана на технологии Ленгмюра. В основе лежит взаимодействие стеариновой кислоты (St) с ионами металлов на границе раздела фаз при нанесении гексанового раствора St на водную субфазу, содержащую соль металла. В результате образуется твердый монослой, одна из поверхностей которого состоит из атомов металла, что позволяет использовать такую структуру, как металл-аффинный сорбент. Сорбент, полученный непосредственно на мишени МАЛДИ при нанесении раствора St на водную каплю, содержащую соль La, обладает специфичной объемной структурой с надломами поверхности. При стекании с капли гексан быстро испаряется на ее краях, что приводит к многократному наползанию новых частей монослоя на предыдущие, их деформации и разрушению. Было установлено, что при последовательном формировании шести монослоев происходит лучшее заполнение сорбентом ячейки мишени.

В качестве модельных белков использовали глобины и сывороточный альбумин человека, а в качестве галогенсодержащего агента прямого алкилирующего действия — N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид. После проведения триптического гидролиза с последующим МАЛДИ-МС-МС анализом было установлено, что глобин человека присоединяет остатки хлорсодержащих агентов с образованием S-алкилированных аддуктов по С-104 в α-субъединице, по С-93 и С-112 в β-субъединице, а альбумин модифицируется по С-34.

Было показано, что хлорсодержащие аддукты обоих белков удерживаются на сформированном сорбенте. При исследовании чувствительности подхода было установлено, что аддукт альбумина может быть обнаружен при соотношении агент:белок 10 мкг:1 мг, аддукт α-субъединицы глобина — 1 мкг:1 мг, аддукт β-субъединицы, содержащий С-93 — 100 нг:1 мг и аддукт β-субъединицы, содержащий С-93 — 1 нг:1 мг. Соответственно, из 4 идентифицированных аддуктов триптический пептид LLGNVLVCClVLAHHFGK бета-субъединицы глобина человека (m/z 1886.986) можно определить как маркерный.

Таким образом, подход «лаборатория на мишени» показал перспективность при исследовании хлорсодержащих аддуктов, позволяя упростить и ускорить процедуру пробоподготовки, снизить количество образца и потери аналита в процессе подготовки к анализу и значительно повысить эффективность МАЛДИ-МС эксперимента.

© Я. К. Калниня, Е. П. Подольская, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ТЕРМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПСЕВДОУЗЛА ДНК НОВОГО ТИПА*

М. А. Канарская, А. А. Ломзов

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

E-mail: makanarskaya@gmail.com

Аннотация

Вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот во многом определят их биологические функции. В геноме человеке обнаружены участки, потенциально способные формировать псевдоузлы TW-типа. Исследованы структура и термостабильность участков ДНК, представленных в геноме человека, потенциально способных формировать псевдоузел TW-типа. Показано, что формирование комплексов модельных олигонуклеотидов такого типа происходит в два этапа. Установлена степень влияния различных участков последовательности TW-типа на формирование и стабилизацию вторичной структуры.

В ИХБФМ СО РАН был обнаружен новый вид вторичной структуры нуклеиновых кислот — псевдоузел TW-типа. Он представляет собой структуру, содержащую два дуплексных участка и три одноцепочечных блока, соединяющих цепи в комплекс, — линкеры. Объектом исследования являлась нуклеотидная последовательность, найденная в геноме человека, и ее различные модификации для выяснения степени влияния различных участков цепи на ее физико-химические свойства. Для изучения термостабильности комплексов был использован метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Почти для всех последовательностей на кривых плавления наблюдается два максимума, что соответствует двум структурным переходам. Так как для некоторых последовательностей был получен только один переход, то можно предположить, что в формировании исследуемого комплекса участвуют 3’-конецевой фрагмент цепи и длинный линкер. Для определения пространственной укладки цепи были использованы методы термической денатурации и кругового дихроизма. Было получено, что в области высоких температур сформировавшийся комплекс ведет себя как B-форма, а при более низких температурах как неканоническая структура. Проведенный методом гель-электрофореза анализ в неденатурирующих условиях показал, что длинный линкер участвует в стабилизации полноразмерного комплекса и играет значимую роль в его формировании, а нуклеотидная последовательность на 3’-конце олигонуклеотида мало влияет на формирование полностью структурированного комплекса. Полученные результаты подтверждают возможность формирования псевдоузелов TW-типа нуклеотидными последовательностями из генома человека.

© М. А. Канарская, А. А. Ломзов, 2021

* Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ 20-04-00719 и базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК- И РНК-ВАКЦИН МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ *IN VIVO* *

Д. Н. Кисаков, Л. А. Орлова, С. В. Шарабрин, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко

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

E-mail: kisakov_dn@vector.nsc.ru

Аннотация

Были отработаны условия эффективной доставки нуклеиновых кислот *in vivo* с использованием плазмид (*phMGFP*, *pDNA_RBD* и *мРНК-RBD*) на самках мышей линии Balb/c с помощью метода электропорация. Было показано, что при трех импульсах прямой и обратной полярности с напряжением 35 В и ограничением по силе тока в 70 мА, длительностью 30 мс и временем между импульсами 970 мс достигается наибольший уровень продукции белка в иммунизированных животных.

Вакцины на основе нуклеиновых кислот — многообещающие вакцинные платформы; их основным недостатком является низкая иммуногенность, которую можно повысить, используя различные способы доставки. В последние годы большой интерес вызывает способ введения нуклеиновых кислот в макроорганизм путем электрических импульсов. Метод электропорации *in vivo* находится на стадии отработки и подбора параметров и условий проведения процедуры как для конкретного вида животного, так и для иммуногена. В связи с этим исследования по подбору оптимальных условий электропорации являются весьма важным направлением в разработке вакцин на основе ДНК или РНК.

Целью исследования была разработка эффективного протокола доставки нуклеиновых кислот (плазмид *phMGFP*, *pDNA_RBD* и *мРНК-RBD*) *in vivo* с использованием метода электропорации.

В работе использовали электропоратор CUY21 EDIT II (BEX Co), электроды (LF650P5), состоящие из пары параллельных стержней диаметром 5 мм. Для снижения болевого синдрома использовался ингаляционный наркоз животных, с применением 2 % изофлурана. Плазмиды *phMGFP*, *pDNA_RBD* и *мРНК-RBD* в количестве 50 мкг, растворенные в буфере PBS, вводили в заднюю бедренную мышцу мышей линии Balb/c с весом 16–18 г путем внутримышечной инъекции и последующим электропорированием *in vivo* с использованием прямоугольных импульсов постоянного напряжения прямой и обратной полярности.

Наиболее эффективным и безопасным протоколом для животных оказалась генерация трех импульсов с напряжением 35 В и ограничением по силе тока в 70 мА, длительностью 30 мс и временем между импульсами 970 мс.

После электропорации *in vivo* флюоресценцию белка GFP оценивали на 21-й день путем анализа среза мышечной ткани с помощью флуоресцентного микроскопа. На основании визуальной оценки эффективность электропорации составляла 70 %, что говорит об успешном биосинтезе белка с плазмидной ДНК (*phMGFP*).

Эффективность электропорации *pDNA_RBD* и *мРНК-RBD* оценивали с помощью ИФА по определению уровня RBD-специфических антител.

Таким образом, были отработаны эффективные условия проведения доставки нуклеиновых кислот с использованием плазмидной ДНК (*phMGFP*), кодирующей GFP. Показано, что электропорация *pDNA_RBD* и мРНК-RBD индуцирует RBD SARS-COV-2-специфические антитела у лабораторных животных.

© Д. Н. Кисаков, Л. А. Орлова, С. В. Шарабрин, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2021

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора РФ.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ГЛИЦИРРИЗИНА И ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА Е-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ

П. А. Кононова[1,2], О. Ю. Селютина[1], Н. Э. Поляков[1]

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

E-mail: kononova_polina@bk.ru

Аннотация

В работе исследовался возможный механизм противовирусной активности глицирризиновой кислоты в отношении SARS-коронавируса, связанный со специфичным взаимодействием с трасмембранным доменом Е-белка. Исследование проводилось на модельном липидном бислое методом ЯМР-спектроскопии.

Известно, что олигомеры Е-белка способны формировать ионные каналы, блокирование которых связывают со снижением репликации коронавирусов. И, хотя ингибирование синтеза Е-белка приводит к существенному (до 200 раз) снижению выхода вирусных частиц из клетки, его влияние на функционирование вирусных частиц остается неясным. В связи с неясной до конца ролью Е-белка в функционировании и патогенезе коронавирусов в целом и SARS-CoV-2 в частности требуются комплексные исследования как взаимодействия самого белка с липидной мембраной, так и влияния различных ингибиторов на процесс взаимодействия и на его активность *in vitro*. Глицирризин, глицирризиновая кислота (ГК) — главное действующее вещество корня солодки. Существует множество данных о ее противовирусной активности, в том числе активности против SARS-коронавируса. Кроме того, в последнее время появился ряд работ, указывающих на перспективность применения ГК для терапии SARS-CoV-2. Несмотря на обилие исследований активности ГК против различных вирусов, механизм ее противовирусного действия остается неясным. В частности, имеющиеся в литературе данные указывают на то, что ГК может выступать в роли ингибитора ионных каналов, образованных Е-белком коронавируса.

Целью работы было проверить гипотезу таргетного воздействия ГК на Е-белок коронавируса для понимания механизма противовирусного действия ГК. Это позволит заложить фундаментальную основу ее применения в качестве препарата для лечения. Для этого были проведены эксперименты по исследованию трансмембранного домена Е-белка SARS-CoV-2 с молекулами ГК в растворах и в модельных липидных мембранах. Были обнаружены изменения времен спин-спиновой и спин-решеточной релаксации молекул липидов в присутствии ГК и трансмембранного домена е-белка, что свидетельствует об их взаимодействии с бислоем.

© П. А. Кононова, О. Ю. Селютина, Н. Э. Поляков, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ УПАКОВКИ И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЭМАЛЕВЫХ ПРИЗМ ЧЕЛОВЕКА ПРИ НАРУШЕННОМ АМЕЛОГЕНЕЗЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ*

А. С. Коршунов[1], В. П. Конев[1], В. Д. Вагнер[2], Е. А. Рогачев[3], К. Н. Курятников[1], А. П. Скурихина[1], А. А. Бондарь[1]

[1]Омский государственный медицинский университет Минздрава России
[2]Национальный медицинский исследовательский центр стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва
[3]Омский государственный технический университет

E-mail: Andrey_K_180588@mail.ru

Аннотация

Установлено, что эмалевые призмы в группе с нарушенным амелогенезом представлены наличием локальных и тотальных гипоминерализованных участков, где более зрелые призмы изменяют форму менее зрелых, которые в конечном итоге приобретают уродливые очертания и созревают в неблагоприятных и экстремальных условиях.

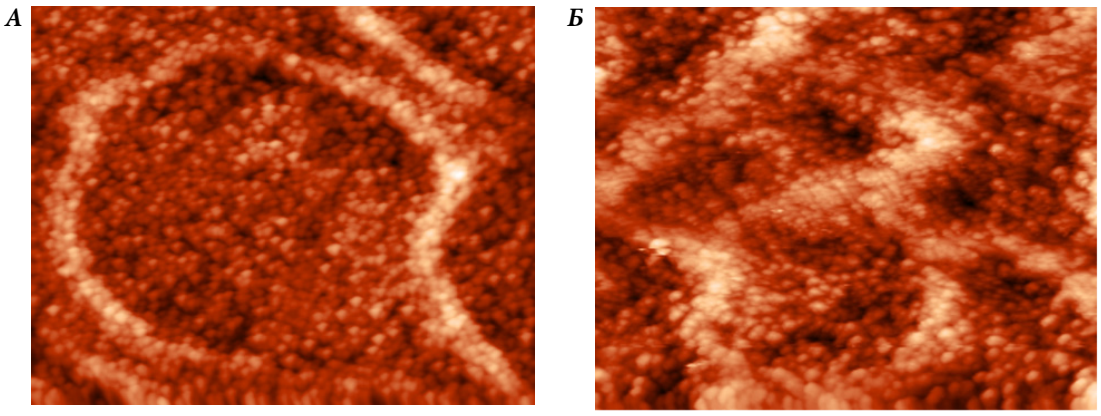
Эмаль зубов является уникальной биологической тканью, которая содержит до 95 % минерального вещества и 1,3 % белка (Леонтьев, 2016). Несмотря на малое количество органического матрикса, он оказывает выраженное воздействие на структуру эмалевых призм, изменяя их пространственную конфигурацию и упаковку (Коршунов, 2020). Описанный процесс свидетельствует о том, что эмаль обладает своеобразными и уникальными биологическими свойствами, механизмами воспроизводимости (Леонтьев, 2016). Указанные физические процессы в эмали недостаточно исследованы и ставятся под сомнение исследователями (Шумилович, 2015; Gibson, 2011).

Цель

Цель работы — изучить характер взаимоотношения эмалевых призм на разных этапах созревания при нарушенном амелогенезе и без него методом атомно-силовой микроскопии.

Материал и методы

Забор интактных нижних восьмых зубов проводился у лиц мужского пола в возрастах 15–20, 21–30, 31–40 лет по медицинским показаниям. Исследованную группу составили лица с нарушенным амелогенезом, установленным по методике ОмГМУ, и группу сравнения без нарушенного амелогенеза. Эмаль указанных зубов дозированно шлифовали, полировали до 14-го класса чистоты по методикам ОмГМУ. Анализировали упаковку, размер, ориентацию эмалевых призм в программе Image Analysis NT-MDT. Математическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica 12.0 (StatSoftInc. USA).



Типичное строение эмалевой призмы в 15–20 лет: *А* — в группе сравнения; *Б* — в группе с нарушенным амелогенезом (атомно-силовая микроскопия). Ув. × 100 000

© А. С. Коршунов, В. П. Конев, В. Д. Вагнер, Е. А. Рогачев, К. Н. Курятников, А. П. Скурихина, А. А. Бондарь, 2021

* Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А21-121011590006-8 и при поддержке фонда «УМНИК» (Договор № 15815ГУ/2020).

Результаты

Эмаль зуба человека с нарушенным амелогенезом в 15–20, 21–30 лет содержит мелкие призмы, после 30 лет достигает значительно больших размеров (по длине в 15–20 лет $\chi^2 = 9,69$, $p = 0,0101$ относительно группы 31–40 лет; по ширине в 15–20 лет $\chi^2 = 10,01$, $p = 0,0092$ относительно группы 31–40 лет).

В 15–20 лет в эмали зубов встречаются тотальные участи гипоминерализации, после 20 лет локальные (по расстоянию между эмалевыми призмами в 15–20 лет $\chi^2 = 10,87$, $p = 0,0073$ относительно группы 31–40 лет) (см. рисунок, Б).

В группе сравнения эмалевые призмы представлены крупными размерами, плотной упаковкой, ровными контурами и очертаниями границ в различных ее участках (по длине в 15–20 лет $U = 8,6538$, $p = 0,0014$ между сравниваемыми группами, по длине в 21–30 лет $U = 9,4412$, $p = 0,0006$ между сравниваемыми группами, в 31–40 лет $U = 5,4881$, $p = 0,0202$ между сравниваемыми группами; по ширине в 15–20 лет $U = 5,6289$, $p = 0,02965$ между сравниваемыми группами, в 31–40 лет $U = 8,2983$, $p = 0,0048$ между сравниваемыми группами) (см. рисунок, А). Рост эмалевых призм происходит быстрыми темпами, после 30 лет на всем протяжении эмалевых призм гипоминерализованных участков не наблюдается.

Выводы

Эмалевые призмы в группе с нарушенным амелогенезом характеризуются наличием локальных и тотальных гипоминерализованных участков, что подтверждает предположение ряда зарубежных исследователей о разной скорости созревания эмалевых призм в пределах одного зуба.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ

А. В. Мартышина[1], О. М. Тилинова[1], С. И. Кисиль[2], М. В. Ямашев[2], И. В. Докукина[1], Е. А. Грачев[2]

[1]Саровский физико-технический институт — филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ
[2]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E-mail: ivdokukina@mephi.ru

Аннотация

Метаболическая гибкость печени является важным механизмом гликемического контроля организма человека. Способность печени переключаться между различными режимами работы в зависимости от состояния организма обеспечивается действием сложной сигнальной системы. Данная работа посвящена теоретическому исследованию процессов, обеспечивающих функционирование этой сигнальной системы.

Метаболическая гибкость гепатоцитов позволяет печени переключаться из режима интенсивной переработки и запасания глюкозы в режим ее высвобождения в кровь в зависимости от текущего состояния организма. Эта способность клеток печени необходима для поддержания стабильного уровня глюкозы в крови как после приема пищи, так и в период голодания [1].

Для периода приема пищи характерен избыток глюкозы в крови, в ответ на который бета-клетки поджелудочной железы вырабатывают инсулин. Для уменьшения уровня глюкозы инсулин стимулирует синтез гликогена из глюкозы, а также процессы гликолиза и липогенеза с последующим выделением печенью в кровь липопротеинов очень низкой плотности, необходимым для обеспечения энергетических нужд организма [2].

Переход к состоянию голодания происходит в результате естественного уменьшения уровня глюкозы в крови, что приводит к прекращению выработки инсулина и, соответственно, его воздействия на печень. Вместо этого альфа-клетки поджелудочной железы начинают вырабатывать глюкагон, который стимулирует высвобождение глюкозы из гликогеновых запасов печени, а также процесс глюконеогенеза — сложный процесс синтеза глюкозы из глицерола и других нетипичных субстратов. Воздействие глюкагона на процессы выделения глюкозы гепатоцитами происходит через опосредованные ионами кальция сигнальные пути [3].

Авторами ранее опубликовано теоретическое исследование особенностей процесса кальциевой сигнализации в гепатоцитах, приводящих к развитию диабета II типа [4]. В данной работе эта модель существенно расширена путем явного учета процессов метаболизма глюкозы и липидного обмена.

Результаты моделирования хорошо согласуются с существующими представлениями о функционировании гепатоцитов в отношении выработки, запасания и метаболизма глюкозы. Кроме того, модель позволяет исследовать возможные причины возникновения патологий метаболизма.

Литература

1. Theurey P., Tubbs E., Vial G., Jacquemetton J., Bendridi N., Chauvin M. A., Alam M. R., Le Romancer M., Vidal H., Rieusset J. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver // J. Mol. Cell Biol. 2016. Vol. 8(2), P. 129–143. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw004.

2. Wang J., He W., Tsai P. J., Chen P. H., Ye M., Guo J., Su Z. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease // Lipids in Health and Disease. 2020. 19:72. https://doi.org/10.1186/s12944-020-01210-0.

3. Samuel V., Shulman G. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux // J. Clin. Invest. 2016. Vol. 126(1), P. 12–22. https://doi.org/10.1172/JCI77812.

4. Dokukina I. V., Yamashev M. V., Samarina E. A., Tilinova O. M., Grachev E. A. Calcium-dependent insulin resistance in hepatocytes: mathematical model // J. Theor. Biol. 2021. 522. 110684. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110684.

© А. В. Мартышина, О. М. Тилинова, С. И. Кисиль, М. В. Ямашев, И. В. Докукина, Е. А. Грачев, 2021

THE MUTANT VARIANT OF PAH GENE EX5DEL4232INS268 WHICH ENCODES THE HUMAN ENZYME PHENYLALANINHYDROXYLASE AND ITS IMPACT ON THE FUNCTIONS OF THIS ENZYME

A. V. Mayakovskaya[1,2], G. P. Volynets[1]

[1]*Institute of Molecular Biology and Genetics, Kiev, Ukraine*
[2]*Central Research Laboratory, Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol*

E-mail: anastasiia.maiakovska@gmail.com

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is a hereditary disorder which appears in particular due to missense mutations of the PAH gene. We have built three-dimensional structures of human wild type PAH enzyme and PAH enzyme with mutation EX5del4232ins268 highly distributed in PKU patients in Ukraine. After that, we have compared structures of mutant PAH with wild type enzyme and analyzed structural changes which can result in this mutation and then cause PKU.

There are hereditary disorders determined by the mutations in genes. The major molecular defects causing PKU are missense mutations of the PAH gene. The major molecular defects determined by phenylketonuria are missene-mutations of the PAH gene. The mutation R408W of the PAH gene is higly distributed in the population of Ukraine and composes 51.5 % and the big deletion of the 5 exone of the PAH gene EX5del4232ins268 — with 1.66 % frequency [Pampukha, 2016].

The homology modeling 3-dimentional structures of wild type human homothetramerics of PAH and mutant with deletion EX5del4232ins268 is conducted via web-server Swiss Model (http://swissmodel.expasy.org). For modeling in silico as a matrix we used the crystal structure of the rat PAH enzyme (PDB ID: 5FGJ) [Meisburger, 2016].

In the process of analyzing the tree-dimensional structure of homology models PAH, it was mentioned that significant structural reorganizations occur as the result of deletion of five exon. This can be explained by the fact that in this exon the PAH gene encodes the aminoacids that formed the alfa-helix and end disordered sections. This alfa-helix locates near the active center of enzyme.

The aminoacids of active center are presented by Arg247, Gly249, Lys251, Ala322 and Glu330 [Andersen, 2001]. An alfa-helix and end disordered sections of phenylalaninhydroxylase enzyme encoded by the fifth exon of the PAH gene contact with aminoacids of the active site of its enzyme. Thus, we can take hypothesis that the alfa-helix and end disordered sections deletion from positions 148 to 170, (which are encoded by the fifth exon of the PAH gene) lead to significant structural changes of the enzyme which can change its functions.

Probably, this mutation may lead to the decrease of affinity Fe ion and decrease the inhibitory of action of tetrahydrobiopterin to PAH. This can glorify the deterioration of catalysis hydroxylation of L-phenylalanine and its conversion to L-Tyrosine and, thus, leads to hereditary disorder — phenylketonuria. It was detected that the aminoacid sequences of the enzyme involved in creating the alfa-helix and end disordered sections encoded by the fifth exon of the PAH gene locates in the interaction interface of tetramer subunits PAH enzyme, its C-terminal sections. This can specify that EX5del4232ins268 mutation may provide for the changing character of interaction of two subunits between themselves, influencing the general structure of tetramer of phenylalaninehydroxylase and, therefore, its functions.

© A. V. Mayakovskaya, G. P. Volynets, 2021

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ АДРОННОЙ ТЕРАПИИ ИОНАМИ ^{12}C С ДОКСОРУБИЦИНОМ И ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ С ДОКСОРУБИЦИНОМ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ШЕЙКИ МАТКИ

А. А. Мельникова, Д. А. Балдов

Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ

E-mail: angelik_melnikova@mail.ru

Аннотация

В данном исследовании была рассмотрена возможность совместного применения доксорубицина — распространенного в клинической медицине химиопрепарата широкого спектра действия — и двух видов ионизирующего излучения для повышения эффективности лечения рака шейки матки.

Объектом исследования являлись клеточные культуры опухоли шейки матки человека линии HeLa, культивированные в стандартных условиях при температуре 37 °С и 5%-м содержании CO_2.

Клетки линии HeLa инкубировали с препаратом доксорубицин в дозе 0,004 мг/мл. На первую группу клеток воздействовало только ионизирующее излучение, на вторую — иониизрующее излучение и доксорубицин, еще одну группу клеток инкубировали с препаратом без действия ионизирующего излучения. Контролем служили клетки без воздействия обоих агентов. Для предотвращения репарации клеток после процедуры облучения клетки выдерживали при температуре 2–4 °С.

Облучение и дозиметрия. Гамма-облучение проводилось на гамма-установке ГУР-120 в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (ФГБНУ ВНИИРАЭ) в четырех дозах (1, 2 и 4 Гр) в пробирках Эппендорфа на расстоянии 73 см от облучателя с мощностью дозы 0,9 Гр/мин.

Облучение ионами ^{12}C проводили на каскаде ускорителей на базе У-70 Института физики высоких энергий (ИФВЭ) ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт» (г. Протвино). Энергия ионов на выходе из ускорителя составляла 455,8 МэВ/нуклон; мощность дозы и доза облучения в зонах I, II и III кривой Брэгга соответственно составили 0,1, 0,2 и 0,05 Гр/мин и 2,2–5,3 Гр, 0,6–3,8 Гр и 1,4–4,0 Гр.

Для оценки эффективности воздействия агентов была выбрана концепция синергизма по выживаемости клеток через 2 часа после облучения. Для сравнения синергических эффектов между двумя видами комбинированного воздействия по аналогии с концепцией синергизма был предложен коэффициент отношения эффектов.

В результате проведенной работы были получены следующие результаты. Выживаемость клеток линии HeLa после комбинированного действия исследуемых агентов от 0 до 1,15 Гр достоверно не отличается. При повышении дозы различия становятся достоверными и выходят на плато (начиная с 2 Гр).

Отношение эффектов в дозе 1 Гр оказалось равным 0,812 ± 0,024, что входит в пределы ошибки и показывает равную эффективность комбинированного действия доксорубицина с гамма-излучением и с облучением ионами ^{12}C в дозах до 1 Гр. Отношение эффектов в дозе 1,5 Гр оказалось равным 2,0 ± 0,0, а отношение эффектов в дозе 2 Гр — 4,5 ± 0,2. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что с повышением дозы комбинированное воздействие доксорубицина и облучения ионами ^{12}C становится эффективнее, чем комбинированное воздействие гамма-излучения и того же химиопрепарата.

Заключение

В рамках экспериментальной работы произведено сравнение эффективности комбинированно действия доксорубицина с гамма-излучением и облучением ионами ^{12}C на примере клеток линии HeLa. Полученные данные можно использовать в клинической практике

© А. А. Мельникова, Д. А. Балдов, 2021

ALBUMIN CONJUGATES AS MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST AGENTS *

D. E. Mitin, K. D. Petrov, D. A. Suvorov, A. S. Chubarov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

E-mail: chubarovalesha@mail.ru

Abstract

Albumin is the most abundant protein in human body and plays a crucial role in transporting various endogenous and exogenous molecules. In this paper we developed a class of nitroxide contained macromolecular constructs conjugated to human serum albumin (HSA) as potential contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI).

MRI is a powerful non-invasive tool for clinics. The MRI specificity can be improved by the addition of a contrast agent. The most efficient of currently-used contrast agents are paramagnetic gadolinium chelates. However, the low stability of some chelates and, thus, the release of toxic metal ions from chelates provide for harmful oxidative stress, mitochondrial dysfunction, mutagenicity, etc. Therefore, there is sufficient interest in the production of "metal-free" MRI contrast agents. In this work, we tried to produce MRI probes using organic radical contrast agents (ORCAs) based on nitroxides.

HSA represents the primary carrier for fatty acids; affects the pharmacokinetics of many drugs; can be a platform for drug discovery, suitable transport for therapy and diagnostics. HSA is an attractive candidate for drug delivery systems due to its enhanced uptake in tumor tissue, biodegradability, stability, etc. The project's main aim was to develop convenient and efficient methods for synthesizing modified HSA protein with variable amounts of sterically-shielded nitroxyl radicals of different types [1, 2]. Five new albumin-nitroxide conjugates were prepared and tested as metal-free ORCAs for MRI. Each HSA bears 20–25 nitroxides conjugated via homocysteine thiolactone moieties [3]. The conjugates were characterized by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), MALDI ToF MS, dynamic light scattering (DLS), SDS PAGE, and circular dichroism spectroscopy. Initial cell tests of biocompatibility (MTT test) showed no cytotoxicity. The relaxivities r_1 and r_2 in water and blood and ^{1}H-MRI phantom images were obtained *in vitro* and *in vivo*.

References

1. Dobrynin S., Kutseikin S., Morozov D., Krumkacheva O., Spitsyna A., Gatilov Y., Silnikov V., Angelovski G., Bowman M. K., Kirilyuk I., Chubarov A. Human Serum Albumin Labelled with Sterically-Hindered Nitroxides as Potential MRI Contrast Agents // Molecules. 2020. Vol. 25. P. 1709.

2. Chubarov A. Albumin Conjugates as MRI Agents [Online source] // Encycl. Platf. 2021. https://encyclopedia.pub/7333.

3. Chubarov A. S. Homocysteine Thiolactone: Biology and Chemistry // Encyclopedia. 2021. Vol. 1. P. 445–459.

© D. E. Mitin, K. D. Petrov, D. A. Suvorov, A. S. Chubarov, 2021

* The research was performed with the financial support of RSF, project No. 21-74-00120, and grant of the President of the Russian Federation СП-4330.2021.4.

ОВОТИОЛ А: АНТИОКСИДАНТ И ФОТОПРОТЕКТОР*

Н. А. Осик, Е. А. Зеленцова, Ю. П. Центалович

Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет

E-mail: n.osik@tomo.nsc.ru

Аннотация

В работе представлена характеристика антиоксидантной активности овотиола А. Методами лазерного импульсного фотолиза и стационарной оптической спектроскопии исследованы реакции окисления овотиола А перекисью водорода и восстановления его окисленной формы глутатионом, а также процесс тушения фотовозбужденного состояния кинуреновой кислоты овотиолом А.

Овотиол А (OSH) является низкомолекулярным антиоксидантом природного происхождения. Обладая крайне низкой константой диссоциации, OSH эффективно нейтрализует окислители в клетках. Интерес к изучению данного соединения был вызван обнаружением необычно высокой концентрации OSH в ткани хрусталика некоторых пресноводных рыб [1, 2], что позволило выдвинуть предположение об участии OSH в механизме защиты клеток от пагубных фотоиндуцированных процессов. Целью данной работы является характеризация фотохимических и окислительно-восстановительных реакций с участием OSH, ранее не описанных в литературе.

Методами оптической спектроскопии были исследованы ключевые процессы антиоксидантной активности OSH, такие как его окисление перекисью водорода и последующее восстановление окисленной формы овотиола (OSSO) глутатионом (GSH), а также процесс тушения фотовозбужденного триплетного состояния кинуреновой кислоты (KNA) молекулами OSH. В работе были измерены константы скорости данных реакций, что позволило оценить эффективность OSH в качестве антиоксиданта. В результате удалось установить, что OSH нейтрализует перекись водорода гораздо быстрее, чем GSH. При этом в ходе двухстадийной реакции с внутриклеточным GSH OSSO быстро восстанавливается до своей активной формы; таким образом, OSH осуществляет надежную внутриклеточную антиоксидантную защиту. Кроме того, в работе были впервые зарегистрированы спектры интермедиатов изучаемых процессов. Вдобавок к ярко выраженным антиоксидантным свойствам OSH превосходно тушит реакционно активное триплетное состояние KNA с константой скорости дифузионно-контролируемой реакции и потому действует как фотопротектор.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют уникальную функциональность овотиола А как сильного антиоксиданта и надежного фотопротектора клеток живых организмов с естественной антиоксидантной защитой на основе глутатиона. Это делает перспективным дальнейшее исследование практического применения OSH в качестве внешнего препарата для борьбы с окислительным стрессом и фотоиндуцированными повреждениями.

Литература

1. Yanshole V. V. et al. Ovothiol A is the main antioxidant in fish lens // Metabolites. 2019. Vol. 9. No. 5. P. 95.

2. Tsentalovich Y. P. et al. Most abundant metabolites in tissues of freshwater fish pike-perch (Sander lucioperca) // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. No. 1. P. 1–12.

© Н. А. Осик, Е. А. Зеленцова, Ю. П. Центалович, 2021

* Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-2272.2020.3).

NITROXIDES AS A VERSATILE TOOL FOR REVERSIBLE PROTEIN AND PROTEIN-NUCLEIC ACIDS COMPLEXES INVESTIGATION *

K. D. Petrov, D. E. Mitin, D. A. Suvorov, A. S. Chubarov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

E-mail: chubarovalesha@mail.ru

Abstract

Pulsed Dipolar Spectroscopy (PDS) methods of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) were used to detect and characterize reversible non-covalent dimers of Human Serum Albumin (HSA) and Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and DNA complexes.

Pulsed dipolar Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy, represented mainly by pulsed electron-electron double resonance (PELDOR or DEER), provides for nanometer distance measurements between spin labels site-specifically attached to the molecules of interest. Nitroxyl radicals are the most common spin labels used in structural studies of proteins, nucleic acids, and complexes. Recently, more stable and sensitive DEER measurements triarylmethyl radicals appeared as a new alternative with outstanding spectroscopic properties.

Based on the previous work and experience, we examined the mechanism of broad substrate specificity of the enzyme that carries out the initial stages on the path of excision repair of the bases (Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1). To examine the mechanism of broad substrate specificity of enzymes, we used PELDOR spectroscopy detection of DNA conformational changes during DNA binding and lesion recognition. Precisely, in the present work, we synthesized several DNA duplexes (various lengths; sequence; structures of lesions, etc.) containing the damaged site. The lesions are located in one strand of the DNA, and spin labels were attached at the complementary strand's 5'- and/or 3'-ends. The nitroxide label was attached to the APE1 using alkylating nitroxide reagent.

Using the PELDOR method, we examined the formation of reversible non-covalent dimers of spin-labeled Human Serum Albumin (HSA), the most abundant protein in human plasma. The spin labels, MTSL or triarylmethyl OX063 radical, were attached to Cys-34 residue in albumin. Dilution experiments with unlabeled HSA indicated non-covalent HSA dimers in equilibrium with monomeric HSA. At physiologically relevant concentrations, HSA does form weak, non-covalent dimers with a well-defined structure. Dimer formation is readily reversible into monomers. Dimerization is very relevant for the role of HSA in transport, binding, and other physiological processes.

References

1. Chubarov A., Spitsyna A., Krumkacheva O., Mitin D., Suvorov D., Tormyshev V., Fedin M., Bowman M. K., Bagryanskaya E. Reversible Dimerization of Human Serum Albumin // Molecules. 2021. Vol. 26. P. 108.

© K. D. Petrov, D. E. Mitin, D. A. Suvorov, A. S. Chubarov, 2021

* The researches were supported by the grant of the President of the Russian Federation СП-4330.2021.4. and cooperative program Mikhail Lomonosov of the RF Ministry of Education and DAAD.

ВЛИЯНИЕ КАРДИОПЛЕГИЧЕСКОГО РАСТВОРА «КУСТОДИОЛ» НА БЫСТРЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ

С. Г. Романова[1,2], Ш. Р. Фролова[1,2], М. М. Слотвицкий[1], А. К. Бережной[1], В. А. Цвелая[1,2], М. А. Попов[2], Д. В. Шумаков[2], Д. И. Зыбин[2], К. И. Агладзе[1,2]

[1] Московский физико-технический институт, Москва
[2] Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

E-mail: sandaara.romanova@phystech.edu

Аннотация

Методом patch-clamp изучена активность быстрых натриевых каналов предсердных кардиомиоцитов человека до и после введения кардиоплегического раствора «Кустодиол». Полученные данные использованы в математическом моделировании, скорость проводимости волны возбуждения в сердечной ткани уменьшается в ~1,5 раза.

При исследовании молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, необходимы корректные модели, которые полностью отвечают электрофизиологическим параметрам кардиомиоцитов человека. В настоящее время большинство математических моделей основывается на экспериментальных данных, полученных на животных моделях, однако они не эквивалентны человеческим. Альтернативной моделью считается культура кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Электрофизиологические данные, полученные от реальных человеческих кардиомиоцитов, выделенных из небольших хирургических образцов, могут создать основу, на которую можно опираться при создании любой математической модели работы сердца человека в норме и при патологии. Это позволит быстро и без дополнительных экспериментов спрогнозировать возможные изменения в электрической проводимости сердца при нарушениях функции потенциалзависимых ионных каналов.

Известно, что при операциях на открытом сердце использование кардиоплегического раствора в сочетании с гипотермией позволяет избежать глобальной ишемии сердца. Цель исследования: изучить электрофизиологические свойства INav предсердных кардиомиоцитов человека с помощью метода patch-clamp до и после введения кардиоплегического раствора Кустодиол, чтобы выяснить влияние Кустодиола на функцию ионных каналов.

Полученные на предсердных кардиомиоцитах человека данные показали, что под влиянием кардиоплегического раствора Кустодиол в течение 90 минут уменьшается амплитуда быстрого натриевого тока INa_v со сдвигом активационной кривой вправо; это указывает на то, что часть быстрых натриевых каналов инактивирована.

На основе полученных методом patch-clamp экспериментальных данных о INa_v с помощью математического моделирования было показано, что изменения электрофизиологических свойств быстрых натриевых каналов под влиянием Кустодиола приводят к уменьшению скорости проводимости волны возбуждения в сердечной ткани в ~1,5 раза.

© С. Г. Романова, Ш. Р. Фролова, М. М. Слотвицкий, А. К. Бережной, В. А. Цвелая, М. А. Попов, Д. В. Шумаков, Д. И. Зыбин, К. И. Агладзе, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С АЛЬБУМИНОМ МЕТОДАМИ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ*

Н. Э. Санникова[1], И. О. Тимофеев[1], А. С. Чубаров[2], Н. Ш. Лебедева[3,4], А. С. Семейкин[4], И. А. Кирилюк[5], Ю. П. Центалович[1], М. Боуман[5,6], М. В. Федин[1], Е. Г. Багрянская[5], О. А. Крумкачева[1]

[1] *Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[3] *Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН, Иваново*
[4] *Ивановский государственный химико-технологический университет*
[5] *Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[6] *Алабамский университет, Таскалуса, США*

E-mail: sannikova.epr@gmail.com

Аннотация

В настоящее время порфирины широко используются в фотодинамической терапии рака в качестве фотосенсибилизаторов (ФС). Эффективность терапии зависит от способности ФС связываться с различными белками и его локализации в комплексе, поэтому актуальной задачей является разработка информативных методов исследования структуры таких комплексов.

Одним из методов изучения структурных и функциональных свойств биополимеров является метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Поскольку большая часть биологических систем диамагнитна, ЭПР применяется с использованием парамагнитных спиновых меток. Недавно был предложен совершенно новый класс спиновых меток на основе фотовозбужденных триплетных состояний порфиринов. Это позволило увеличить чувствительность импульсных ЭПР-методик, что существенно сокращает время накопления при малой концентрации образца. Для демонстрации возможностей ЭПР-спектроскопии в исследованиях биологических систем с ФС были исследованы комплексы человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с двумя порфиринами: водорастворимым катионным TMPyP4 и гидрофобным амфифильным тетра(гидроксифенил)порфирином mTHPP. Для получения наиболее полной информации о комплексах было установлено расположение фотоактивных молекул относительно поверхности белка с помощью экспериментов ESEEM. Также методом PELDOR были получены функции распределения по расстояниям между фотовозбужденным триплетным состоянием фотосенсибилизаторов и нитроксильным радикалом, селективно введенным в ЧСА. Таким образом, была установлена локализация порфиринов: TmPyP4 связывается с ЧСА в полости в центре четырехспирального пучка субдомена IB, mTHPP — в кармане субдомена IIIA. Различная локализация порфиринов отражает и различные фотофизические свойства порфиринов в комплексе. Так, было обнаружено, что в результате фотолиза TmPyP4 / ЧСА синглетный кислород, генерируемый порфирином, вызывает структурное возмущение белка. В случае порфирина mTHPP структурных изменений не было обнаружено.

Особый интерес в качестве ФС представляет хлорин e6. Его локализация в комплексе с ЧСА также была исследована с помощью дипольной ЭПР-спектроскопии с использованием ортогональных меток: иона Cu^{II}, который связывается в N-конце белка, и селективно введенной в белок нитроксильной метки. Такой подход позволяет с высокой точностью определить все сайты связывания фотомолекул. Недавно было показано, что ЧСА образует нековалентные димеры, доля которых может достигать 50 %. В результате на основе экспериментальных данных была предложена модель пространственного расположения хлорина в комплексе с димерами ЧСА. Было установлено, что хлорин e6 связывается с ЧСА в одном сайте, расположенном в субдомене IB.

Таким образом, импульсная ЭПР-спектроскопия является крайне информативным подходом для изучения структурных и функциональных свойств комплексов ФС с биомолекулами, и, следовательно, их эффективности в фотодинамической терапии рака.

© Н. Э. Санникова, И. О. Тимофеев, А. С. Чубаров, Н. Ш. Лебедева, А. С. Семейкин, И. А. Кирилюк, Ю. П. Центалович, М. Боуман, М. В. Федин, Е. Г. Багрянская, О. А. Крумкачева, 2021

* Работа выполнена при поддержке РНФ № 20-73-10239.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ

Ю. С. Северюхин

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

E-mail: yucucumber@mail.ru

Аннотация

Головной мозг человека может быть подвержен воздействию протонов в результате медицинского облучения, а также в ходе пилотируемой космической миссии. Несмотря на большое количество исследований в данной области, проблема оценки поведенческих реакций и морфологических изменений в ЦНС после воздействия ядер ^{1}H остается нерешенной ввиду отсутствия очевидной связи между структурными и функциональными нарушениями. Проведенные исследования существенно различаются по типу используемого ионизирующего излучения, срокам, в которые происходит оценка того или иного эффекта, фракционированию, пространственному дозовому распределению, животным моделям.

Цель

Данное исследование направлено на изучение поведенческих реакций и морфологических изменений в головном мозге половозрелых крыс после воздействия протонами с энергией 170 МэВ и 70 МэВ.

Материалы и методы

Гамма-облучение ^{60}Co крыс линии SD (самки 15-недельного возраста) в дозе 1 Гр проводили на установке РОМУС-М МТК ОИЯИ. Облучение протонами с энергиями 170 и 70 МэВ в дозе 1 Гр проводили на фазотроне МТК ОИЯИ. Для оценки поведенческих реакций использовали тест-системы «Открытое поле» и «Т-лабиринт». Анализ морфологических изменений в различных отделах головного мозга проводили с использованием окрашивания крезилвиолетом по Нисслю, конго-красным и Fluoro Jade B. Гистометрический анализ структурных изменений нейронов проводили в программе ImageJ.

Результаты

При анализе поведенческих реакций в Т-лабиринте было выявлено, что воздействие ионизирующего излучения с различным ЛПЭ привело к увеличению числа актов повторного захода в рукава лабиринта в тесте спонтанного чередования. Анализ адаптации животных к установке «Открытое поле» показал, что в группе облученных животных (протоны 70 МэВ в пике Брэгга) происходит снижение общей двигательной активности. Снижение числа вертикальных стоек наблюдалось во всех группах облученных животных. При морфологическом анализе выявлено развитие раннего амилоидоза, аутолиз эпендимального слоя, увеличение числа нейродегенеративных изменений в различных структурах головного мозга и развитие гипертрофии нейронов на 30-е сутки после облучения.

Выводы

Воздействие протонами в дозе 1 Гр приводит к развитию структурных и функциональных нарушений в ЦНС животных на 30-е сутки после облучения. Полученные данные свидетельствуют о нарушении кратковременной памяти, исследовательского поведения животных и снижении двигательной активности. С увеличением ЛПЭ происходит увеличение числа амилоидных бляшек в переднем мозге крыс, аутолиз эпендимального слоя желудочков, развитие дегенеративных изменений.

© Ю. С. Северюхин, 2021

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ: ФОРМИРОВАНИЕ КАНАЛОВ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ*

В. Н. Сырямина[1,2], М. Де Дзотти[3,4], Ф. Формаджо[3], С. А. Дзюба[1,2]

[1] *Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*
[3] *Университет Падуи, Италия*
[4] *Институт биомолекулярной химии, Падуя, Италия*

E-mail: v_syryamina@kinetics.nsc.ru

Аннотация

Мембрано-активные антимикробные пептиды потенциально являются новыми лекарственными препаратами. Предполагается, что основной механизм действия пептидов заключается в формировании проводящих каналов при достижении пороговой концентрации пептидов в мембранах. Проблемой для этого объяснения, однако, является то, что активность ряда пептидов наблюдается и при концентрациях ниже пороговых. В связи с этим возникла гипотеза, что при низких концентрациях пептидов их локальное влияние на упорядоченность липидов, латеральную организацию или механические свойства липидной мембраны является альтернативным механизмом действия пептидов.

В работе представлены результаты по формированию пептидами различной длины и активности каналов в липидных мембранах, а также влияние на локальную латеральную организацию мембраны в широком концентрационном диапазоне пептид/липид.

С тех пор, как антимикробные пептиды были признаны потенциальными агентами против бактериальных, раковых и грибковых заболеваний, механизмы действия пептидов активно изучаются с целью последующей оптимизации их применения. Класс мембранно-активных пептидов (МАП) привлекает особое внимание в связи с их неспецифическим взаимодействием с клеточной мембраной, что снижает вероятность возникновения устойчивости к противомикробным препаратам. Поскольку считается, что для МАП основной механизм действия заключается в формировании проводящих каналов, значительное количество работ посвящено изучению деталей строения каналов. В то же время для ряда пептидов антимикробная активность или повышение проницаемости мембраны для маленьких молекул наблюдается и при более низких концентрациях пептида в мембранах. Это свидетельствует о возможных альтернативных механизмах действия МАП.

Для изучения основного и альтернативного механизмов действия пептидов были использованы методы спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в комбинации с направленным спин-мечением биологических молекул. Преимущество спектроскопии ЭПР заключается в чувствительности: изучение деталей каналообразования возможно с малых концентраций пептидов (пептид/липид ~ 1/2 000), а при изучении альтернативных механизмов действия пептидов на структуру мембраны наблюдения ведутся за молекулами липидов, что также позволяет использовать сверхмалые концентрации пептида.

Для пептидов средней длины (аламетицин, тилопептин) обнаружено ступенчатое формирование каналов, начиная с концентраций пептид/липид ~ 1/2 000, в то время как для относительно малого пептида трихогина процесс каналообразования происходит при более высоких концентрациях пептида в мембране. Показано, что присутствие пептидов в мембране приводит к перераспределению сигнальных молекул в липидном бислое, причем олигомеры пептидов «притягивают» к себе сигнальные молекулы [1–4].

Литература

1. Afanasyeva E. F., Syryamina V. N., Dzuba S. A. J Chem Phys. 2017. Vol. 146, 011103.
2. Syryamina V. N., De Zotti M., Formaggio F., Toniolo C., Dzuba S. A. PCCP. 2018. Vol. 20. P. 3592–3601.
3. Afanasyeva E. F., Syryamina V. N., De Zotti M., Formaggio F., Toniolo C., Dzuba S. A. BBA: Biomembranes. 2019. Vol. 1861(2), P. 524–531.
4. Syryamina V. N., Sannikova N. E., De Zotti M., Gobbo M., Formaggio F., Dzuba S. A. BBA: Biomembranes. 2021. 183585.

© В. Н. Сырямина, М. Де Дзотти, Ф. Формаджо, С. А. Дзюба, 2021

* Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 21-73-00011).

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДИСФУНКЦИИ БЕТА-КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

О. М. Тилинова[1], М. В. Ямашев[2], И. В. Докукина[1], Е. А. Грачев[2]

[1]Саровский физико-технический институт — филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ
[2]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E-mail: ivdokukina@mephi.ru

Аннотация

Основной функцией бета-клеток поджелудочной железы является экзоцитоз инсулина, происходящий в ответ на повышение уровня глюкозы в крови. Дисфункция механизма экзоцитоза приводит к инсулиновой недостаточности и развитию диабета II типа. Могут существовать различные причины возникновения дисфункции. Данная работа посвящена исследованию их роли и взаимного влияния при развитии патологии системы гликемического контроля.

Экзоцитоз инсулина бета-клетками поджелудочной железы запускается при повышении уровня глюкозы в крови. Нарушение механизма секреции инсулина приводит к гипергликемии и последующему развитию диабета II типа. Выделение инсулина является кальций-зависимым процессом и, соответственно, зависит от нормального функционирования кальциевой сигнализации [1].

Бета-клетки поджелудочной железы являются электрически-возбудимыми, и основным механизмом попадания ионов кальция в цитозоль является вход из внеклеточного пространства через потенциал-зависимые каналы плазматической мембраны (ПМ). Позже запускается дополнительный механизм высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Протекание и эффективность процесса кальциевой сигнализации во многом определяется взаимным расположением ключевых органелл (ЭР и митохондрий) по отношению друг к другу и к ПМ [2, 3].

Авторами работы построена математическая модель, учитывающая особенности взаимного расположения органелл, ПМ и работу обоих механизмов кальциевой сигнализации. Проведена верификация модели на имеющихся экспериментальных данных. Исследование модели позволяет сделать определенные выводы о роли расположения митохондрий в развитии нарушений кальциевой сигнализации, впоследствии могущих привести к дисфункции механизма экзоцитоза инсулина.

Литература

1. Baynes J., Dominiczak M. Medical biochemistry. Elsevier. 2018. 5th ed.

2. Brun T., Maechler P. Beta-cell mitochondrial carriers and the diabetogenic stress response // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Cell Research, 1863. 2016. P. 2540–2549.

3. Scorrano L., De Matteis M. A., Emr S. et al. Coming together to define membrane contact sites // Nat. Commun. 2019. Vol. 10. P. 1287.

© О. М. Тилинова, М. В. Ямашев, И. В. Докукина, Е. А. Грачев, 2021

ЭФФЕКТЫ ЛИГАНДОВ А2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ ГИППОКАМПА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИИ*

Д. П. Токальчик

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

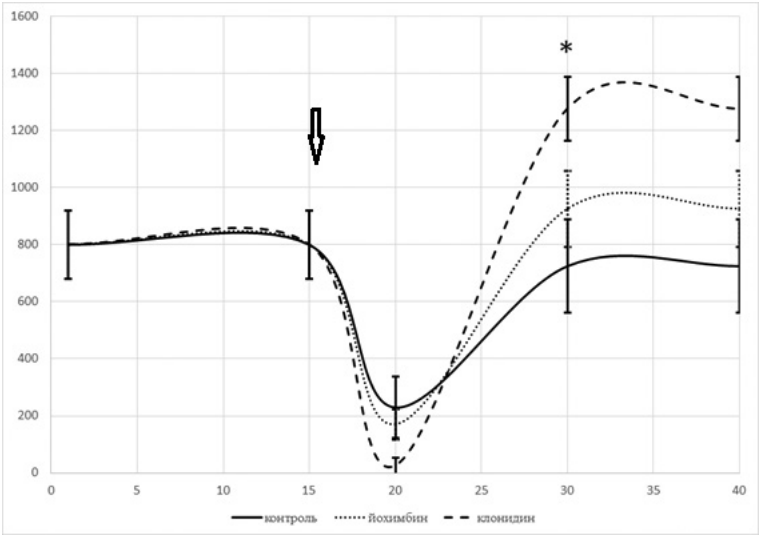
E-mail: d.tokalchik@gmail.com

Аннотация

Активация или блокада α2-адренорецепторов CA1 области гиппокампа сопровождается изменением электрической активности нейронных сетей в условиях моделирования острой гипоксии. Адреномиметик клонидин в условиях гипоксии потенциирует амплитуду вызванных ответов, а адреноблокатор йохимбин не оказывает значимого влияния на характер передачи сигналов между нейронами.

Лиганды α2-адренорецепторов применяют в терапии артериальной гипертензии и других заболеваний. Предполагаемое наличие их нейропротекторных свойств недостаточно исследовано. Цель работы заключалась в анализе эффектов активации или блокады α2-адренорецепторов CA1 области срезов гиппокампа на амплитудно-временные характеристики вызванных ответов на фоне моделирования гипоксии.

Регистрацию сигналов в срезах гиппокампа толщиной 400 мкм у четырехнедельных крысят (n = 30) выполняли в аппаратно-программном комплексе для исследования электрической активности нейронов. Стимулирующий электрод помещали в области коллатералей Шаффера, а регистрирующие электроды: в stratum radiatum (запись возбуждающих постсинаптических потенциалов, ВПСП), и в stratum pyramidale (популяционные спайки). Интервал между импульсами стимуляции составлял 20 с, амплитуда — 20–30 мкА, частота — 0,05 Гц, длительность стимула — 0,2 мс. Записывали фоновую активность в течение 15 минут, затем моделировали пятиминутную гипоксию путем замены перфузионного раствора, содержащего 95 % O_2 на 21 % O_2; далее в концентрациях 3 мкг/мл в течение 20 минут до полного стабильного восстановления амплитуд вызванных ответов вводили: 1) α2-адреномиметик клонидин; 2) α2-адреноблокатор йохимбин. В качестве контроля — неоксигенированную перфузионную жидкость. Нативные данные записывали с помощью программы NFS view (операционная система QNX Neutrino). Для графического отображения, фильтрации данных и расчета характеристик вызванных ответов использовали программу Spike Char. Для оценки достоверности различий использовали U-критерий Манна — Уитни для независимых выборок и Т-критерий Уилкоксона для зависимых выборок.



Изменение амплитудно-временных характеристик вызванных ответов ВПСП на фоне введения адренореактивных препаратов в условиях моделирования пятиминутной гипоксии. Стрелкой отмечено время начала моделирования гипоксии и введения субстанций. Достоверные ($p < 0,05$) отличия отмечены звездочкой (*)

Результаты эксперимента показали, что амплитуда ответов ВПСП в группе контроля на фоне гипоксии снизилась в среднем на 71 % ($p < 0,05$) с ее последующим восстановлением до 91 % ($p < 0,05$) от первоначальных значений. Амплитудно-временные характеристики ВПСП в группе контроля и на фоне введения йохимбина достоверно не отличались. Введение клонидина в условиях гипоксии сопровождалось достоверно более выраженным снижением амплитуд ВПСП с их последующим восстановлением в среднем на 59 % ($p < 0,05$) выше первоначального (см. рисунок).

© Д. П. Токальчик, 2021

* Исследования выполнены при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20М-104).

Наблюдаемое усиление электрической активности вызванных ответов демонстрирует сохранение жизнеспособности нейронов и предполагает минимизацию последствий неврологического дефицита. Форсированное снижение активности нейронов под воздействием клонидина предположительно связано с гиперполяризацией мембран, что ведет к уменьшению клеточного энергопотребления. Амплитуды популяционного спайка обладали значительной вариабельностью, однако отмечена тенденция к пролонгированию периода восстановления амплитуд на фоне как активации, так и блокады α2-адренорецепторов. Таким образом, активация α2-адренорецепторов в гиппокампе сопровождается модификацией протективных процессов в нейронах CA1 области гиппокампа в ответ на острую гипоксию.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОМАСШТАБНЫХ ДОМЕНОВ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КРС*

Д. В. Шамаева, К. А. Окотруб, Н. В. Суровцев

Институт автоматики и электрометрии СО РАН, Новосибирск

E-mail: dvshamaeva@gmail.com

Аннотация

В мембранах клеток могут формироваться домены различного химического состава и конформационного состояния, регулирующие ряд важных для жизни клетки процессов. Многокомпонентные фосфолипидные бислои являются распространенной моделью биологических мембран, которая используется при изучении состава доменов и особенностей фазового разделения. Метод спектроскопии КРС позволяет получить информацию о составе доменов и масштабах фазового разделения. В данной работе изучено разделение образцов высушенных и полностью гидратированных модельных мембран DOPC-DPPCd62-Chol на конформационно упорядоченную и разупорядоченную фазы на микронном масштабе. Причем состав фаз отличается для гидратированных и высушенных образцов. Данная работа демонстрирует перспективность спектроскопии КРС применительно к исследованию фазового разделения в модельных мембранах. Выявленный эффект изменения состава фаз при изменении гидратации может играть важную роль при лиофилизации биологических объектов.

Биологические мембраны являются неотъемлемым элементом клеток, участвующим, прямо или косвенно, во всех биологических процессах. Клеточные мембраны обладают сложным химическим и фазовым составом и состоят преимущественно из фосфолипидов. В мембранах могут формироваться домены упорядоченных фаз (рафты) с разным химическим составом и конформационным состоянием углеводородных цепочек фосфолипидных молекул. Считается, что состав доменов регулирует ряд важных для жизнедеятельности клетки процессов, например, транспортировку метаболитов и передачу информации между клетками. Во многих биофизических задачах в качестве модели клеточных мембран используются многокомпонентные фосфолипидные бислои.

Распространенной системой, в которой возможно формирование фосфолипидных рафтов, является смесь ненасыщенного липида 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DOPC) с насыщенным липидом 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолином (DPPC) или его дейтерированным аналогом ($DPPC_{d62}$), и холестерином (Chol). Фазовая диаграмма DOPC-$DPPC_{d62}$-Chol наиболее подробно изучалась методами ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) и флуоресцентной микроскопии. Однако эти подходы имеют определенные недостатки. Метод ЯМР не позволяет изучать размеры доменов. Метод флуоресцентной микроскопии предполагает встраивание в образец крупных молекул (меток), которые могут влиять на разделение фаз в образце, и не дает информации о составе фаз. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) обладает преимуществом по сравнению с упомянутыми методиками. Это бесконтактная, неразрушающая методика, которая позволяет получить информацию как о масштабах фазового разделения, так и об их химическом составе и конформационном состоянии.

В данной работе метод картирования КРС был адаптирован для изучения фазового разделения в модельных фосфолипидных мембранах. Был изучен масштаб доменов конформационно упорядоченной и разупорядоченной фаз в высушенных и полностью гидратированных планарных структурах DOPC-$DPPC_{d62}$-Chol с различными молярными долями компонентов.

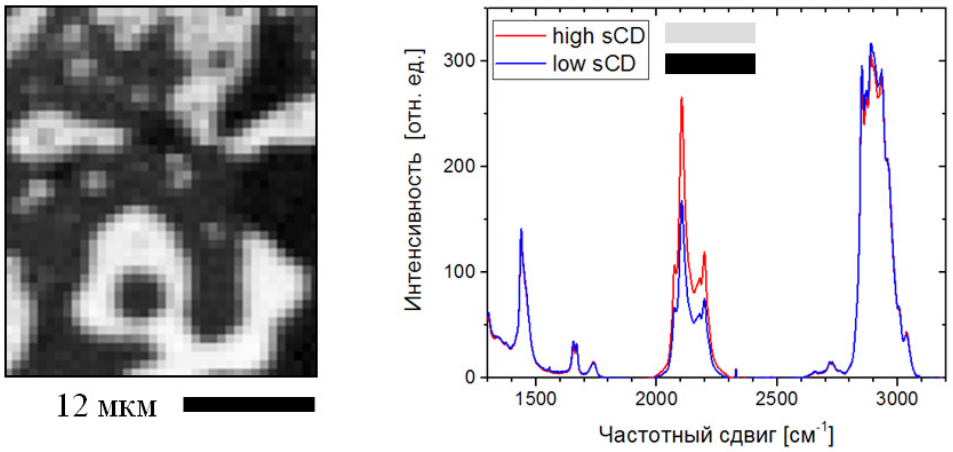
Методом осаждения однослойных везикул из водной суспензии были подготовлены высушенные и гидратированные образцы мембран DOPC-$DPPC_{d62}$-Chol толщиной 10–100 бислоев. На КРС-картах образцов обнаружено разделение на домены упорядоченной и разупорядоченной фаз на микронном масштабе. Разделение присутствует и в высушенных, и в гидратированных структурах DOPC-DPPCd62-Chol. Сделана оценка состава доменов методом разложения спектров КРС на вклады DOPC, $DPPC_{d62}$ и Chol. Построены фазовые диаграммы высушенных и гидратированных планарных структур DOPC-DPPCd62-Chol. Фазовые диаграммы демонстрируют, что разделение на домены в гидратированных образцах происходит иначе, чем в высушенных. В высушенных планарных структурах при любой концентрации холестерина (из исследованных) смесь разделяется на домены с содержанием DPPCd62 > 80 мол %, соответствующие упорядоченной гелевой фазе, и домены с содержанием DPPCd62 ~20 мол %, соответствующие конформационно разупорядоченным липидам. В гидратированных составах с концентрацией холестерина менее 10 мол % наблюдается более низкая доля холестерина для фазы с высокой

© Д. В. Шамаева, К. А. Окотруб, Н. В. Суровцев, 2021

* Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №19-12-00127.

долей $DPPC_{d62}$, а для составов с более высокими концентрациям холестерина (> 10 мол %), тренд обратный: фаза с высокой долей $DPPC_{d62}$ содержит высокую долю холестерина.

Данная работа демонстрирует перспективность спектроскопии КРС для изучения фазового разделения и состава фосфолипидных мембран. Выявленный эффект изменения состава фаз при изменении степени гидратации может играть важную роль, например, при лиофилизации биологических объектов.



Пример КРС-карты (слева) и усредненных спектров фаз (справа) высушенного DOPC-DPPCd62-Chol = 1-1-1

II

БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ ЖИРОВОЙ ДИСТРОФИИ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Т. В. Брус, А. Г. Васильев, С. С. Пюрвеев, А. А. Кравцова, Л. Д. Балашов

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России

E-mail: bant.90@mail.ru

Аннотация

Неалкогольная (НАЖБП) и алкогольная жировая болезни печени (АЖБП) являются основными примерами патологии печени метаболического и токсического генеза. Согласно современным рандомизированным исследованиям, частота развития этих патологий неуклонно растет с каждым годом [2].

В настоящее время ввиду отсутствия четкого понимания причин и патогенеза гепатопатий неинфекционного генеза нет эффективных методов профилактики и лечения этих состояний. Ключевую роль в изучении этиологии и механизмов патогенеза играют адекватные экспериментальные модели печеночной недостаточности.

Предложенные способы биомоделирования позволяют воспроизвести исследуемые патологии в кратчайшие сроки и отражают основные патогенетические звенья поражений печени различного генеза у человека.

Актуальность работы

Алкоголизация населения — тяжелая социальная и медицинская проблема, в связи с чем, распространенность алкогольной жировой болезни печени достаточно высока и составляет 25–40 % среди взрослого населения [1, 2]. Эпидемиологическое соотношение АБП / НАЖБП составляет 10:1 [2]. Особенную настороженность вызывает распространение неалкогольной жировой болезни печени среди детского населения [3].

Цель

Цель работы — выявить и сравнить патологические изменения у лабораторных крыс при моделировании жировой болезни печени различного генеза.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 34 самцах крыс Wistar с массой тела на момент включения в эксперимент 150–210 г. Были сформированы 3 экспериментальные группы:

1) НАЖБП — крысы, получавшие в качестве корма пищевые брикеты, содержащие 50 % фруктозы по массе и обычную питьевую воду (n = 12);

2) АЖБП — крысы, которые получали стандартизированный корм для грызунов и 15 % раствор этилового спирта вместо питьевой воды (n = 12);

3) Контроль — крысы, которые получали стандартизированный корм для грызунов и обычную питьевую воду (n = 10).

Длительность эксперимента составила 35 суток. В ходе исследования оценивалось изменение массы тела, массы печени, морфометрические и гистологические изменения печени в экспериментальных группах.

Результаты исследования

В ходе эксперимента удалось воспроизвести и отработать экспериментальные модели НАЖБП и АБЖП. В исследовательских группах были зарегистрированы следующие морфологические изменения. Средний вес крыс группы с НАЖБП увеличился на 94,67 г, средняя масса печени в данной группе составила 11,17 г (на 39,5 % больше по сравнению с контрольной группой). Средний вес крыс с АЖБП увеличился на 74, средняя масса печени в данной группе составила 8,45 г (на 5,6 % больше, чем в контроле). Гистологическое исследование животных с развившейся АБП выявило баллонную жировую дистрофию гепатоцитов, наличие телец Мэллори. При гистологическом исследовании крыс с НАЖБП жировая инфильтрация гепатоцитов была выявлена в меньшей степени.

© Т. В. Брус, А. Г. Васильев, С. С. Пюрвеев, А. А. Кравцова, Л. Д. Балашов, 2021

Литература

1. Брус Т. В., Васильев А. Г. Современное представление о неалкогольной болезни печени // Российские биомедицинские исследования. 2020. Т. 5. № 1. С. 18–25.

2. Трашков А. П., Брус Т. В., Васильев А. Г., Артеменко М. Р., Печатникова В. А., и др. Биохимический профиль крыс с неалкогольной жировой болезнью печени различной степени тяжести и его коррекция препаратом Ремаксол // Педиатр. 2017. Т. 8. № 4. С. 78–85.

3. Трашков А. П., Брус Т. В., Васильев А. Г., Артеменко М. Р., Печатникова В. А., и др. Динамика показателей красной крови у крыс с неалкогольной жировой болезнью печени и возможности ее коррекции // Клиническая патофизиология. 2017. Т. 23. № 3. С. 66–72.

СУБСТРАТЫ С РЕГУЛИРУЕМЫМИ МЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНОЗАВИСИМОГО ПОВЕДЕНИЯ КЛЕТОК*

Ю. М. Ефремов[1,2], П. С. Тимашев[1–4]

[1] *Институт регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины Сеченовского университета, Москва*
[2] *Центр цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения Сеченовского университета, Москва*
[3] *Институт химической физики им. Н. Н. Семенова, Москва*
[4] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E-mail: yu.efremov@gmail.com

Аннотация

Значительное влияние на фенотип и рост клеток оказывают механические свойства субстрата, на котором они растут. Однако установление механизмов механозависимого поведения клеток требует систематических исследований и воспроизводимого изготовления субстратов с заданными механическими свойствами. В данной работе было разработано две системы для создания 2D субстратов с заданными механическими свойствами с применением как синтетического (полиакриламид), так и природного полимера (желатин). Было показано, что разработанные системы хорошо подходят для характеризации клеток с применением таких методов, как атомно-силовая и лазерная сканирующая конфокальная микроскопии.

Известно, что значительное влияние на фенотип и рост клеток оказывают механические свойства субстрата, на котором они растут. Была выявлена способность клеток двигаться в направлении градиента жесткости — дуротаксис. Также было показано, что жесткость субстрата оказывает влияние на дифференцировку стволовых клеток.

Для систематического изучения механизмов механозависимого поведения клеток требуются субстраты с хорошо воспроизводимыми заданными механическими свойствами, обеспечивающими оптимальный рост клеток и возможность их прижизненного изучения с применением различных методов. Целью данной работы было разработать методические подходы для создания 2D субстратов с заданными механическими свойствами, а также подобрать оптимальные условия для культивирования и анализа фенотипа клеток. Механические свойства как гелей, так и клеток измеряли с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Было выбрано две системы для создания 2D субстратов: на синтетическом полимере (полиакриламид) и биополимере (желатин). К полиакриламидным (ПААГ) гелям дополнительно пришивали белки адгезии. Гели из желатина были стабилизированы сшивающим агентом (глутаровый альдегид). Благодаря протоколу полимеризации между стеклами гели имели небольшую толщину (100 мкм), плоскую и ровную поверхность. Гели имели модуль Юнга от (3 ± 1) кПа до (10 ± 1) кПа.

Анализировали механозависимое поведение трех клеточных линий: фибробластов мыши NIH-3T3, эпителия почки собаки MDCK и кератиноцитов человека HaCaT. В экспериментах наблюдалось прикрепление и распластывание клеток, также сравнимое с культуральным пластиком. Обе гелевые системы были стабильны и не разрушались при культивировании клеток (в тестах до семи дней), не вызывали клеточную гибель.

При росте на пластике наибольшую жесткость имели мезенхимальные клетки — фибробласты NIH3T3. Кератиноциты HaCaT имели промежуточную жесткость, а эпителиальные клетки MDCK — наименьшую. При росте на ПААГ и желатиновых гелях с жесткостью 4–10 кПа наблюдалось небольшое уменьшение модуля Юнга фибробластов и кератиноцитов (на 10–30 %), но не у эпителиальных клеток. Разница в механических свойствах эпителиальных клеток и фибробластов позволяет предположить, что они могут быть использованы в качестве фенотипического маркера. Однако требуется больше экспериментов и сравнение с данными молекулярного фенотипирования, что будет сделано в дальнейшем.

© Ю. М. Ефремов, П. С. Тимашев, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук и докторов наук, МК-1613.2020.7.

МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ

Т. Г. Курьянчик, Н. В. Козел

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

E-mail: t.kuryanchyk@gmail.com

Аннотация

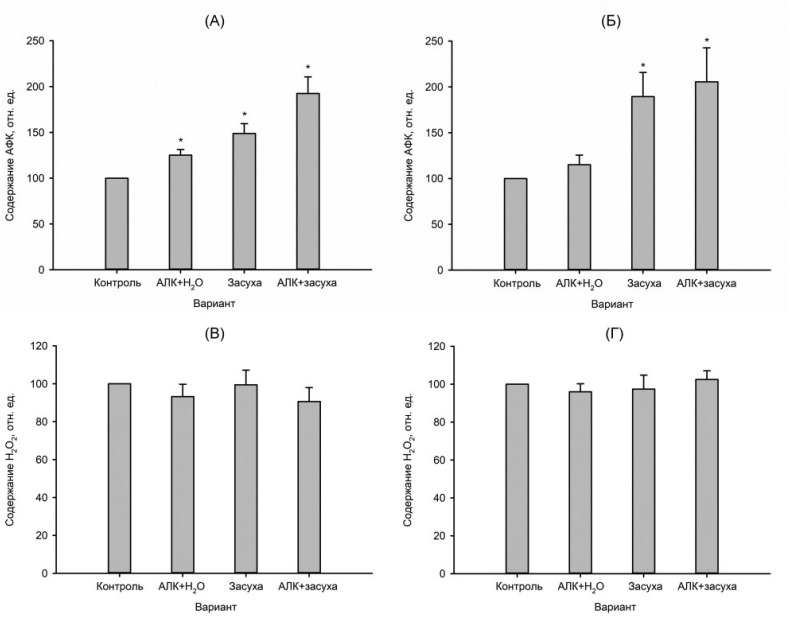
Выдвинута гипотеза о том, что хлоропласты играют ключевую роль в развитии окислительных процессов в растениях ячменя при засухе. Наиболее вероятным механизмом индукции окислительного стресса в таких условиях может быть запуск пигментами-фотосенсибилизаторами в хлоропластных мембранах фотодинамических реакций второго типа.

Ячмень — это зерновая культура, которая занимает ведущее место в сельскохозяйственном производстве. Различные стрессовые факторы, в том числе и засуха, способны приводить к образованию в клетках растений активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, к изменению важных физиологобиохимических процессов в растительном организме, что является причиной снижения урожайности ячменя. Знание механизмов индукции и развития окислительного стресса в клетке позволяет предотвращать неблагоприятные последствия воздействия различных стрессовых факторов путем получения новых сортов, обладающих повышенной устойчивостью, или применения эффективных стрессопротекторов. Таким стрессопротектором может быть 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) — естественный метаболит растительной клетки, предшественник всех тетрапирролов (Яронская и др., 2004).

Целью работы являлось установление механизмов индукции окислительного стресса, вызванного в растениях ячменя почвенной засухой, а также исследование влияния на стрессоустойчивость растений АЛК в концентрации 10 мг/л.

В качестве объекта исследования использовали проростки ячменя сортов Бровар и Аванс, выращенные в лабораторных условиях в режиме 14 ч света и 10 ч темноты при температуре (23 ± 1) °С и относительной влажности воздуха 30 % в нормальных условиях и при засухе. Обработка АЛК в концентрации 10 мг/л производилась опрыскиванием на 4-е сутки после высадки растений в грунт. Общее количество АФК в листьях ячменя определяли с помощью флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (ДХФ-ДА), а содержание пероксида водорода (H_2O_2) — с помощью скополетина (Козел, 2009).

Результаты, представленные на рисунке, четко демонстрируют индукцию окислительного стресса под действием почвенной засухи: во всех опытных вариантах мы наблюдали существенное (до 100 %) увеличения содержания АФК в листьях ячменя (см. рисунок, А, Б).



Изменение содержания АФК (А, Б) и H_2O_2 (В, Г), в частности, в листьях растений ячменя сортов Бровар (А, В) и Аванс (Б, Г), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи; * — различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0{,}05$

© Т. Г. Курьянчик, Н. В. Козел, 2021

Однако обращают на себя внимание три факта. Во-первых, обработка растений АЛК как в опытных (АЛК + засуха), так и контрольных вариантах (АЛК + H_2O) в обоих сортах приводила к увеличению количества АФК по сравнению с необработанными растениями, что может быть причиной активации под действием малых концентраций АЛК метаболических процессов, в первую очередь фотосинтеза и дыхания (Beyzaei & Sherbakov & Averina, 2015; Яронская и др., 2004). Во-вторых, нужно отметить более высокие содержания АФК в условиях засухи в листьях ячменя сорта Аванс (см. рисунок, Б) по сравнению с Броваром (см. рисунок, А), что указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях этого сорта при засухе. И третий важный факт — отсутствие накопления повышенных количеств H_2O_2 на фоне увеличения содержания общего пула АФК при действии почвенной засухи (см. рисунок, В, Г). Это указывает на инициацию окислительного стресса по пути образования синглетного кислорода, а не супероксидного радикала, являющегося предшественником H_2O_2.

Таким образом, можно предположить, что хлоропласты играют ключевую роль в развитии окислительных процессов в растениях ячменя при засухе. Наиболее вероятным механизмом индукции окислительного стресса в таких условиях может быть запуск пигментами-фотосенсибилизаторами в хлоропластных мембранах фотодинамических реакций второго типа.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ ЦЕПИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО

Е. И. Медведева, Т. В. Самович, Н. В. Козел

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

E-mail: peachonkina.elizabeth@gmail.com

Аннотация

Выявлено повышение экспрессии ключевых генов цепи биосинтеза каротиноидов в клетках *H. pluvialis* под действием низких, не приводящих к фотоокислительному стрессу, концентраций фотосенсибилизатора БР, что является необходимым условием для стимуляции повышенного синтеза в клетках водоросли астаксантина.

Зеленая жгутиковая микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) является одним из наиболее перспективных натуральных источников кетокаротиноида астаксантина — красного пигмента, широко используемого в сельском хозяйстве, пищевой, фармакологической промышленности, а также в косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности (Hussein et al., 2006). В клетках *H. pluvialis* содержание астаксантина достигает 5 % от сухой массы водоросли, что делает этот микроорганизм весьма привлекательным для промышленной биотехнологии. Химически синтезированный астаксантин, представляющий собой смесь трех стереоизомеров, отличается от натурального структурно и обладает гораздо меньшей биоактивностью, чем натуральный пигмент. В связи с этим в последние годы значительно возрос интерес к производству *H. pluvialis*. Наиболее важной проблемой при культивировании этой микроводоросли в промышленных масштабах является повышение эффективности продукции ее клетками астаксантина. Есть два основных подхода для решения этой проблемы: изменение клеточного метаболизма путем генетической модификации (чаще всего речь идет о мутагенезе), а также увеличение выхода астаксантина путем оптимизации условий культивирования водоросли с применением определенных химических агентов. Несмотря на то, что первый способ более эффективен, он крайне трудоемкий и длительный. Поэтому в исследовании мы обратились к регуляции метаболизма клеток *H. pluvialis* путем внесения в культуральную среду красителя-фотосенсибилизатора бенгальского розового (БР), способного на свету генерировать молекулярный синглетный кислород (Gandin et al., 1983) и тем самым вызывать накопление в клетках водоросли астаксантина (Козел, 2018). Исследование влияния фотосенсибилизатора БР на систему образования каротиноидов, в частности на экспрессию ключевых генов цепи их биосинтеза в клетках микроводоросли *H. pluvialis*, стало целью данной работы.

В ходе проведенной работы определялся уровень экспрессии генов, кодирующих фитоинсинтазу (*PSY*) и β-каротингидроксилазу (*CHY*), в клетках *H. pluvialis* при культивировании на свету высокой и низкой интенсивности с добавлением и без фотосенсибилизатора БР. В предварительных экспериментах по индукции каротиногенеза этим фотосенсибилизатором было установлено, что высокие концентрации (более 1 мкМ) БР, вызывающие фотоокислительный стресс, в среде инкубации водоросли приводят не только к индукции синтеза астаксантина в клетках *H. pluvialis*, но и к существенному уменьшению количества клеток. Такая стимуляция каротиногенеза оказалась менее эффективной по сравнению с наиболее распространенным способом — действием света высокой интенсивности (более 100 мкмоль квантов/м^2/с). Однако нами было также выявлено, что использование малых концентраций фотосенсибилизатора (0,25–0,5 мкМ) на фоне действия света высокой интенсивности (120 мкмоль квантов/м^2/с) приводит к увеличению продукции *H. pluvialis* астаксантина (Козел, 2018). В последующих экспериментах исследовали именно такой способ запуска синтеза астаксантина в клетках *H. pluvialis*, выдвинув предположение, что стимуляция накопления каротиноидов связана не с фототоксичными свойствами БР, а с сигнальной функцией синглетного кислорода, который эффективно генерируется на свету в присутствии фотосенсибилизатора.

Особенностью определения уровня экспрессии генов *H. pluvialis* является сложность выделения РНК из цист, клеточная оболочка которых настолько плотная, что эффективность экстракции РНК с помощью реагента TRItidy G™ крайне низкая. Это создает определенные трудности для точного количественного анализа уровня экспрессии генов. Однако проведенный в трехкратной биологической повторности эксперимент показал наличие определенных закономерностей. В частности, мы наблюдали тенденцию к увеличению уровня экспрессии гена *PSY,* кодирующего синтез фитоинсинтазы, в клетках *H. pluvialis* при добавлении БР как на свету низкой, так и высокой интенсивности. Если на свету низкой интенсивности абсолютные значения для уровня экспрессии этого гена были крайне низкими (0,00043 ед. для контроля и 0,00366 ед. для варианта с 0,25 мкМ БР), то на свету высокой ин-

© Е. И. Медведева, Т. В. Самович, Н. В. Козел, 2021

тенсивности уровень экспрессии *PSY* увеличивался на несколько порядков (0,01649 ед. для контроля и 1,46891 ед. для варианта с 0,25 мкМ БР). Однако вне зависимости от интенсивности освещения мы наблюдали стимуляцию экспрессии *PSY* в клетках водоросли добавлением в среду инкубации БР.

Анализ экспрессии гена *CHY*, кодирующего синтез β-каротингидроксилазы в клетках *H. pluvialis*, также показал в большей части опытных вариантов тенденцию к ее увеличению при добавлении в среду инкубации фотосенсибилизатора БР как на свету низкой интенсивности, так и высокой (см. таблицу).

Влияние БР на уровень экспрессии ключевых генов биосинтеза каротиноидов (представлены данные отдельных экспериментов)

Интенсивность света	**Концентрация БР, мкМ**	**Ген *PSY***	**Ген *CHY***
		Относительная нормализованная экспрессия, ед.	
Низкая (LI)	0 (контр)	0,00043	0,23501
	0,25	0,00366	0,49543
	0,5	0,00268	0,53101
Высокая (HI)	0 (контр)	0,01649	0,23371
	0,25	0,49543	1,55963
	0,5	н.о.	81,84562

Примечание. Н.о. — не определено.

Таким образом, выявлено повышение экспрессии ключевых генов цепи биосинтеза каротиноидов в клетках *H. pluvialis* под действием низких, не приводящих к фотоокислительному стрессу концентраций фотосенсибилизатора БР, что является необходимым условием для стимуляции повышенного синтеза в клетках водоросли астаксантина.

МОДЕЛИРОВАНИЕ АНИЗОТРОПИИ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОСТИНФАРКТНОГО РУБЦА

Б. А. Римская, А. К. Бережной, М. М. Слотвицкий, В. А. Цвелая

Лаборатория биофизики возбудимых систем Московского физико-технического института, Долгопрудный

E-mail: rimskya.ba@phystech.edu

Аннотация

Потенциальным методом лечения инфаркта миокарда является заместительная клеточная терапия, основные ограничения которой — неполноценное электрофизиологическое встраивание имплантата и низкий уровень выживаемости имплантируемых клеток. Решением данной проблемы является представленный в работе метод имплантации кардиомиоцитов на полимерных микроволокнах, позволяющих формировать архитектуру сердечной ткани и положительно влияющих на адгезию клеток.

Экспериментальная модель представляет монослой желудочковых кардиомиоцитов, выделенных по соответствующему протоколу из крысиных сердец. В качестве клеточного субстрата применяются микроволокна из поликапролактона, полученные методом электроспиннинга. Регистрация волн возбуждения осуществлялась на установке оптического картирования, позволяющей визуализировать распространение потенциала действия с помощью флуоресцентного Ca^{2+}-зависимого красителя.

Далее клеточные образцы фиксировали и проводили иммунофлуоресцентный анализ (рис. 1) с последующей 3D-реконструкцией клеточного монослоя методом конфокальной микроскопии (рис. 2). Было показано, что при наличии микроволокна возрастает экспрессия белка Cx43, отвечающего за формирование межклеточных связей, и увеличивается общее количество прижившихся клеток после имплантации (рис. 3).

Таким образом, применение микроволокон в качестве клеточного субстрата позволяет в несколько раз повысить эффективность функционального встраивания здоровых кардиомиоцитов в монослой сердечной ткани за счет улучшенной клеточной адгезии и образования межклеточных связей.

В целях изучения влияния морфологии клеток на анизотропность среды были проведены эксперименты с микроволокнами в условиях *in vitro* и *in silico* [1, 2]. Было показано, что ткань изменялась как фенотипически — клетки вытягивались вдоль волокон (рис. 4), так и электрофизиологически — скорость проведения в направлении анизотропии была отличной от скорости в ортогональном направлении. Для моделирования постинфарктного рубца была выбрана модель TNNP [3], позволяющая симулировать проведение потенциала действия в неоднородной среде и таким образом выявлять условия возникновения реентри. *In vitro* в качестве неоднородности используется препятствие в форме иглы (рис. 5). Результаты моделирования согласуются с экспериментальными данными, что позволяет существенно ускорить процесс проверки гипотез.

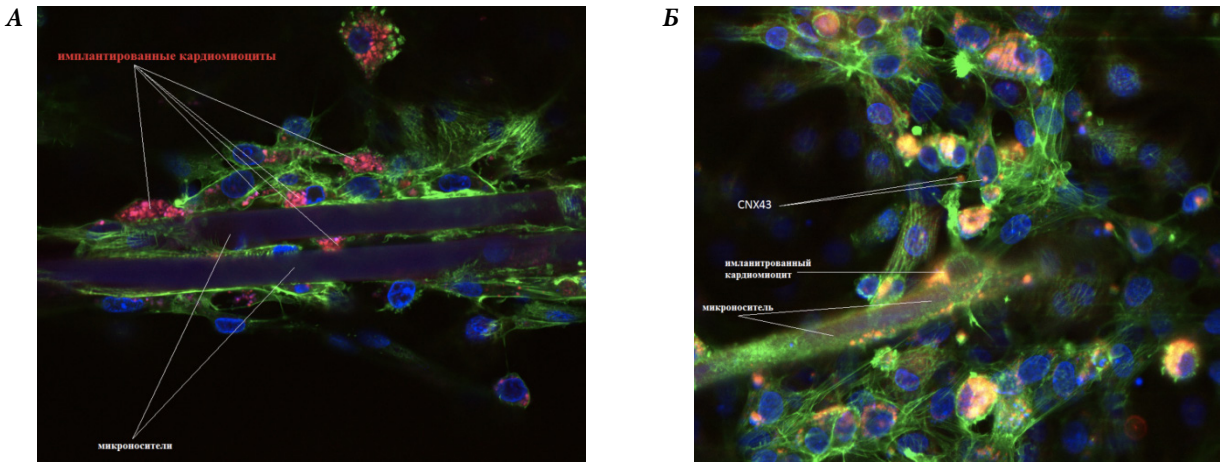


Рис. 1. Кардиомиоциты на микроволокнах:
А — ядра окрашены синим (DAPI), цепи актина показаны зеленым (метки F-актина); *Б* — белок Cx43 окрашен желтым

© Б. А. Римская, А. К. Бережной, М. М. Слотвицкий, В. А. Цвелая, 2021

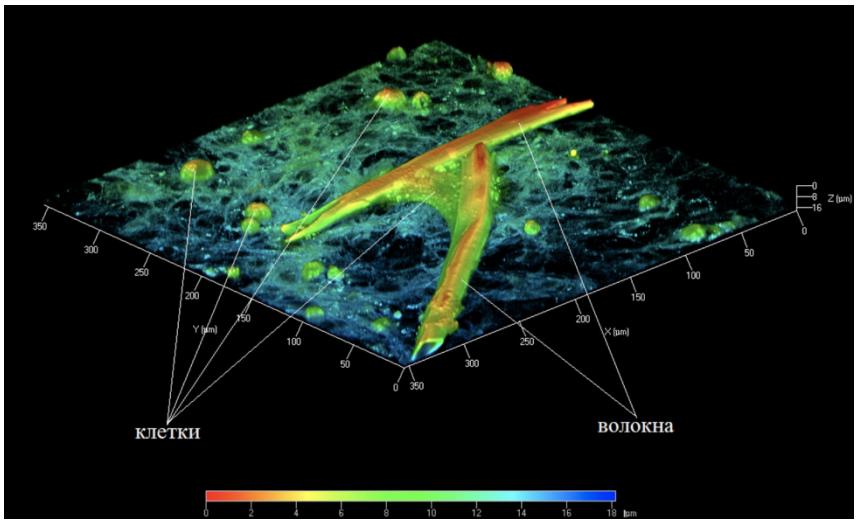
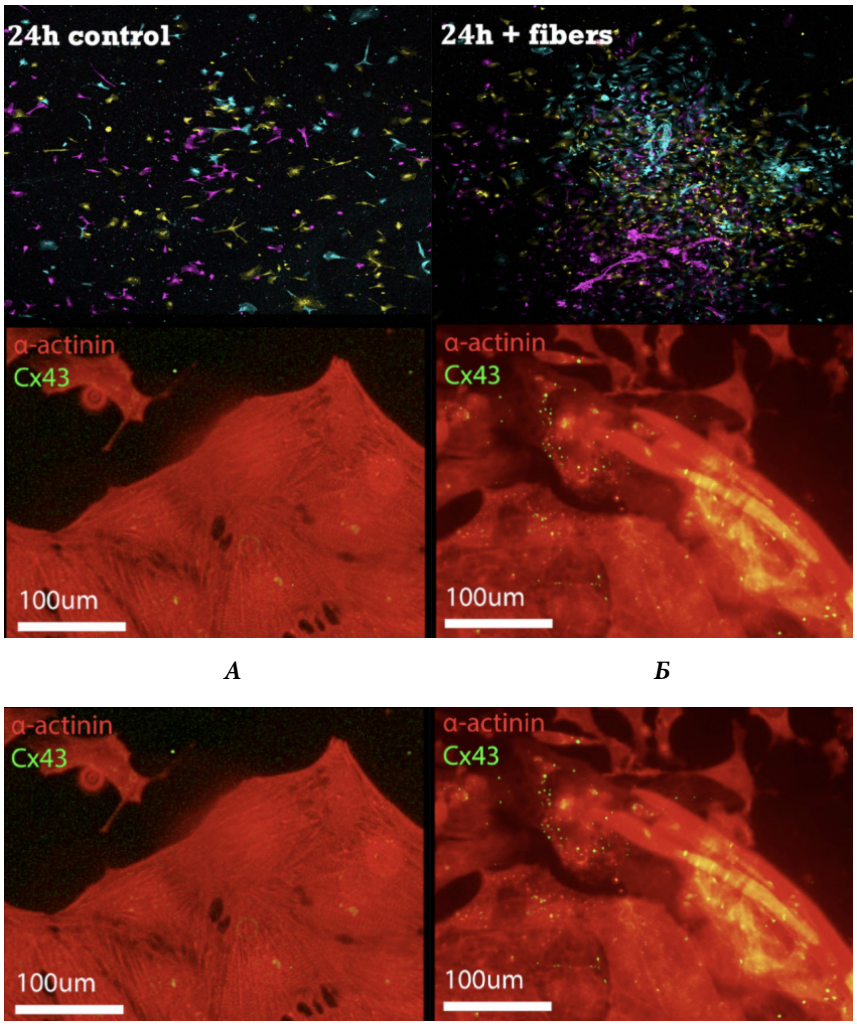


Рис. 2. 3D-реконструкция монослоя кардиомиоцитов на микроволокне



А ***Б***

В ***Г***

Рис. 3. А — монослой кардиомиоцитов без микроволокон; *Б* — с микроволокнами; *В* — экспрессия белка Cx43 в образцах без микроволокон; *Г* — Cx43 в образцах на микроволокнах

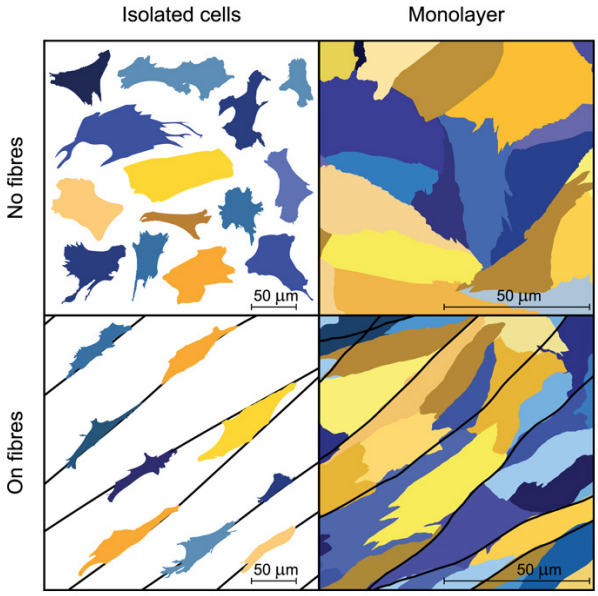
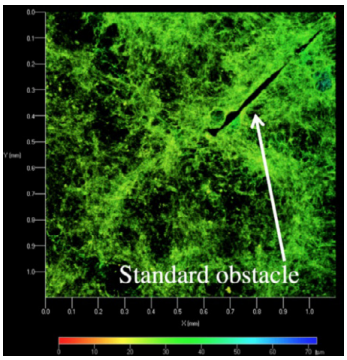


Рис. 4. Изменения морфологии клеток при имплантации на микроволокна и без них

А



Б

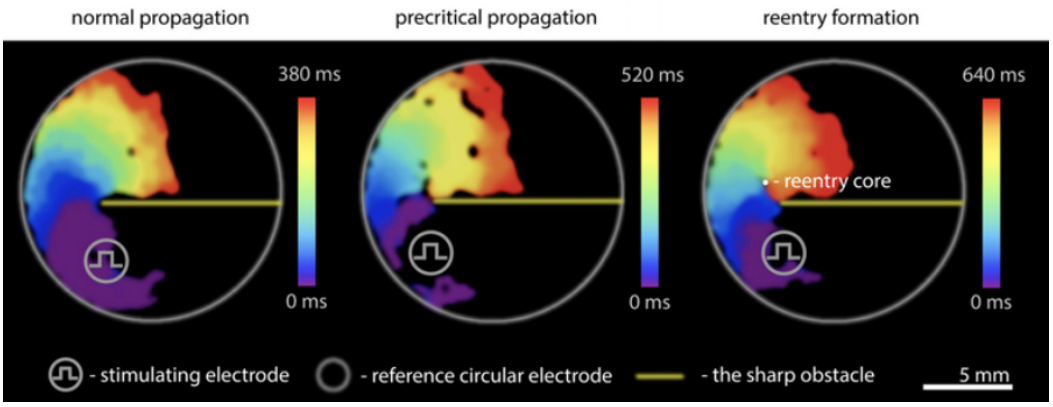


Рис. 5. А — монослой кардиомиоцитов со стандартным препятствием, цепи актина показаны зеленым; *Б* — образование реентри в среде со стандартным препятствием

Литература

1. Kudryashova N. et al. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells // PLoS computational biology. 2019. Vol. 15. No. 3. P. e1006597.

2. Kudryashova N. N. et al. Conditions for waveblock due to anisotropy in a model of human ventricular tissue // PloS one. 2015. Vol. 10. No. 11. P. e0141832.

3. ten Tusscher K. H. W. J. et al. A model for human ventricular tissue // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2004. Vol. 286. No. 4. P. H1573-H1589.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЗОЛЕЙ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БИОСОВМЕСТИМЫМИ ЛИГАНДАМИ*

М. М. Созарукова[1], Е. А. Савинова[2], Е. В. Проскурнина[2]

[1] *Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН*
[2] *Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова*

E-mail: S_MadinaM@bk.ru

Аннотация

Исследованы антиоксидантные свойства наночастиц CeO_2, стабилизированных биосовместимыми лигандами, по отношению к алкилпероксильным радикалам. Данные хемилюминесцентного анализа показали, что наиболее выраженными антиоксидантными свойствами характеризуются коллоидные растворы наночастиц CeO_2, функционализированные цитратом аммония, мальтодекстрином и фосфатидилхолином, по сравнению с немодифицированным золем CeO_2 и индивидуальными растворами стабилизаторов. Было выявлено, что вне зависимости от соотношений золя CeO_2 и лиганда радикал-перехватывающие свойства исследованных образцов обусловлены нанодисперсным CeO_2.

Наночастицы CeO_2 являются ярким представителем нового класса биомиметиков — нанозимов. Способность выполнять функции ряда природных ферментов в сочетании с уникальными физико-химическими свойствами и относительно низкой токсичностью делают нанодисперсный CeO_2 перспективным препаратом для ранней диагностики и терапии заболеваний, в том числе обусловленных окислительным стрессом.

Цель данной работы — анализ антиоксидантных свойств золей CeO_2, стабилизированных биосовместимыми лигандами, по отношению к алкилпероксильным радикалам.

Коллоидные растворы наночастиц CeO_2 (3–5 нм, гидродинамический диаметр 10–11 нм) были получены в результате термогидролиза гексанитратоцерата(IV) аммония [1]. Наночастицы CeO_2 функционализировали цитратом аммония, мальтодекстрином и фосфатидилхолином в мольных соотношениях 1:1, 1:2, 2:1 (для каждого стабилизатора). Антиоксидантные свойства образцов анализировали хемилюминесцентным методом в системе генерации алкилпероксильных радикалов в присутствии люминола [2].

Наблюдали развитие кинетики, характерной для антиоксидантов пролонгированного действия. Добавление к радикал-продуцирующей системе золей CeO_2, стабилизированных лигандами в соотношении 1:1, приводило к ингибированию свечения большой площади. Наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладали модифицированные золи CeO_2 по сравнению с нестабилизированным коллоидным раствором наночастиц CeO_2 (отсутствие мешающего влияния лигандов на биохимическую активность). Исследование образцов CeO_2:-лиганд в соотношениях 1:2 и 2:1 подтвердило тот факт, что радикал-перехватывающие свойства стабилизированных золей обусловлены исключительно нанодисперсным диоксидом церия.

Литература

1. Shcherbakov A. B. et al. Facile method for fabrication of surfactant-free concentrated CeO_2 sols // Mater. Res. Express. 2017. Vol. 4(5). 055008.

2. Alekseev A. V. et al. Determination of antioxidants by sensitized chemiluminescence using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) // Moscow Univ. Chem. Bull. 2012. Vol. 67(3). P. 127–132.

© М. М. Созарукова, Е. А. Савинова, Е. В. Проскурнина, 2021

* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-2763.2021.1.3).

РАЗВИТИЕ ГРАВИТРОПИЧЕСКИХ И НАСТИЧЕСКИХ ДВИЖЕНИЙ В НАДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ ПРОРОСТКОВ ТОМАТА

С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru

Аннотация

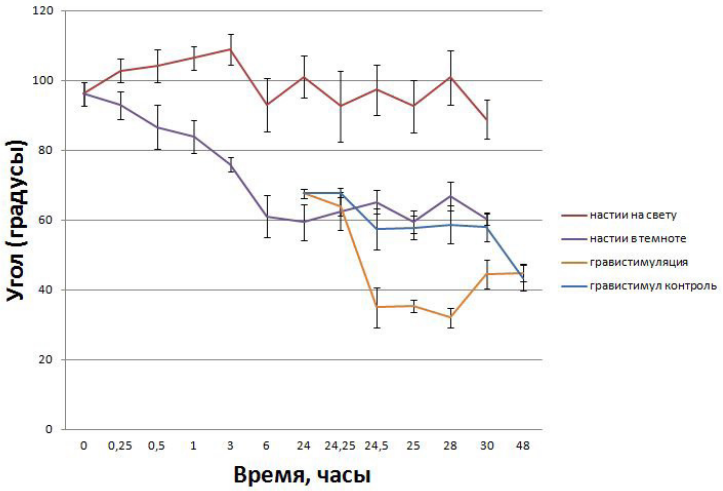
Исследовалось влияние гравистимуляции на семядольные листья и стебли 13-дневных проростков томата. Проведен анализ расположения семядольных листьев томата в темноте и на свету. В темноте определен временной интервал настических движений листьев и движения листьев при отрицательном гравитропизме.

Для стеблей и корней растений характерен отрицательный и положительный гравитропизм, выражающийся в способности реагировать на одностороннее действие вектора гравитационного поля Земли ростовыми изгибами. Наиболее хорошо гравитропический ответ изучен на примере стеблей и корней растений. Исследования по изучению гравитропизма в листьях практически отсутствуют.

В этой связи актуальным представляется проведение анализа влияния гравитационного стимула на пространственное положение и движения листовых пластинок и стебля растений. Одновременно проводились исследования по настическому движению листьев — ответу органов растения на раздражитель, действующий, как правило, равномерно.

Объектом исследования служили проростки томата (*Lycopersicum esculentum* L.). Для оценки двигательной активности семядольных листьев и стебля проростки томата поворачивали на 90° относительно гравитационного вектора Земли и выдерживали в таком положении различные интервалы времени, после чего оценивали изменения положения органов растения в пространстве с помощью программы для обработки изображений в области медицинских и биологических исследований ImageJ 1.37v.

Зафиксированные результаты динамики движения листьев представлены на рисунке. Обнаружено, что в отсутствие гравистимуляции и при росте растений на полихроматическом белом свету (40 Вт, 150 мкмоль $м^{-2}с^{-1}$) положение их семядольных листьев значительно не меняется в течение двух суток наблюдений (внутренний угол между семядольными листьями изменялся в диапазоне с 96,06° ± 3,38° до 88,95° ± 5,58°). Наблюдаемые изменения можно отнести к типу настических. После перемещения растений томата в темноту (без поворота горизонтально) семядольные листья начали двигаться вверх: угол между листьями проростков уменьшился с 96,06° ± 3,38° до 61,00° ± 5,99° через 6 часов воздействия темноты и далее, до 30 часов воздействия, оставался неизменным. При воздействии гравистимула начиная с 30 мин угол между семядольными листьями начал уменьшаться и через 6 часов гравистимуляции составлял 32,02° ± 2,79°. В дальнейшем, после 6 ч и 24 ч гравистимуляции, было зарегистрировано обратное увеличение внутреннего угла между семядольными листьями до 44,6° ± 2,79° и 44,85° ± 2,56° соответственно.



Динамика движения листьев

© С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, 2021

Измерение угла изгиба стебля при гравистимуляции показало, что в период времени 15–60 мин статистически достоверных изменений не зарегистрировано. В период времени 1–3 ч воздействия гравистимула угол изгиба стебля изменился с 176,82° ± 3,53° до 133,1° ± 6,84°, в период 3–6 ч — с 133,1° ± 6,84° до 117,02° ± 4,49°, а в период 6–24 ч — с 117,02° ± 4,49° до 104,7° ± 3,27°.

Анализ двигательной активности листьев показал, что в темноте движение семядольных листьев можно разделить на настии (в первые 6 часов воздействия темноты) и отрицательный гравитропизм (через 15 мин — 6 часов воздействия гравистимула). Первые статистически достоверные изменения угла между семядольными листьями наблюдалась через 30–60 мин воздействия гравистимула, а изменения угла изгиба стебля были зарегистрированы позже, через 1–3 ч воздействия.

Это указывает на то, что к гравистимуляции чувствительны не только стебель и корень растения, но и листья, что, видимо, позволяет надземной части растения быстро адаптироваться к изменениям пространственного положения и восстанавливать нормальную ориентацию в пространстве.

МОЛОЗИВО И МОЛОКО КОЗ: БИОХИМИЧЕСКИЕ И КОЛЛОИДНЫЕ СВОЙСТВА

В. В. Тюлина, И. В. Милаёва, М. С. Царькова

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

E-mail: ira-gurievich@list.ru

Аннотация

Результаты исследования молока коз показали, что наибольшим колебаниям в течение лактации подвержено содержание жира в молоке и молозиве. В первый день лактации содержание жира более низкое, а во второй день повышается в 1,8 раза и остается на таком высоком уровне и на третий день. В дальнейшем происходит снижение этого показателя до минимального значения на четвертый день. Динамическое поверхностное натяжение молока и молозива коз при всех временах существования поверхности выше на 3–5 мН/м в первый день лактации по сравнению с 2–4 днем лактации.

Физико-химический состав молока подвержен влиянию различных факторов: от возраста животного и его рациона питания до происхождения. Одно из наиболее существенных отличий козьего молока — количество и химический состав козьего жира. Средний размер жировых шариков в козьем молоке 2 мкм, что меньше, чем у коровьего — 2,5–3,1 мкм. Более мелкие жировые глобулы равномерно распределены по всему объему козьего молока, что отражается на его коллоидных свойствах, а именно на динамическом поверхностном натяжении (ДПН).

Исследовалось молоко физиологически здоровых коз русской белой породы, полученное в первые семь дней первой лактации. По результатам биохимического анализа отмечено, что у коз происходит изменение содержания жира, белка, лактозы, минеральных солей в молоке в зависимости от дня лактации.

Максимальное количество минеральных солей (выше на 35,34 %), лактозы (выше на 35,2 %), белка (выше на 35,26 %) по сравнению со средним значением остальных дней наблюдается в первый день лактации.

Наибольшим колебаниям подвержено содержание жира в молоке и молозиве коз. В первый день лактации содержание жира более низкое, а во второй день повышается в 1,8 раза и удерживается на таком высоком уровне на третий день. В дальнейшем происходит снижение этого показателя до минимального значения на четвертый день.

Параметры ДПН молока коз в разные дни лактации, мН/м

t эфф., с., мН/м	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6	День 7
1	48,87 ± 0,85	43,48 ± 0,73	46,11 ± 0,25	47,81 ± 1,29	51,59 ± 1,49	46,81 ± 1,09	47,57 ± 0,12
5	46,6 ± 0,43	41,74 ± 0,19	44,03 ± 0,29	44,63 ± 0,32	48,54 ± 1,39	45,93 ± 0,32	46,52 ± 1,54
7	45,77 ± 1,03	40,32 ± 0,73	43,02 ± 1,61	44,33 ± 0,69	47,46 ± 0,31	45,54 ± 0,68	46,04 ± 1,6
10	43,5 ± 1,46	38,19 ± 1,89	41,19 ± 0,9	43,76 ± 1,43	45,67 ± 0,55	44,77 ± 1,22	45,31 ± 1,7

ДПН молока и молозива коз при всех временах существования поверхности выше на 3–5 мН/м в первый день лактации по сравнению с 2–4 днем лактации. По-видимому, это связано с повышенным содержанием минеральных солей в первый день лактации. Повышение уровня жира на 2–3 день приводит к снижению значений ДПН на 10–15 %. С 5–7 дня лактации значения ДПН выше на 5–7 %, что связано с соотношением жира и белка в пробах.

Таким образом, наиболее существенно отличается молоко первого дня лактации (молозиво): в нем содержится значительно больше солей, лактозы и белка. Наибольшим колебаниям подвержено содержание жира в молоке коз. ДПН зависит от биохимического состава молока и молозива, соотношения поверхностно-активных (жир, белок) и поверхностно-инактивных (минеральные соли) компонентов.

© В. В. Тюлина, И. В. Милаёва, М. С. Царькова, 2021

МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО РАСТЯЖЕНИЯ НА ФОНЕ ГИПОКСИИ

Е. Е. Харьковская[1], Г. В. Осипов[1], И. В. Мухина[1,2]

[1] Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
[2] Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

E-mail: elharkov@gmail.com

Аннотация

В данной работе описываются результаты исследования изменения электрической активности изолированного сердца крысы в зависимости от механического воздействия в условиях гипоксии методом мультиэлектродного картирования гибкими матрицами.

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти во всем мире. По этой причине актуальной задачей является изучение электрофизиологических механизмов адаптации сердца к изменению внешних условий.

В сердце существуют интеркардиальные механизмы регуляции работы сердца. В частности, по некоторым данным, даже в отсутствие регуляции со стороны центральной нервной системы при растяжении устья полых вен и стенок правого предсердия (ПП) активируется рефлекс Бейнбриджа — адаптационный физиологический механизм, направленный на увеличение ЧСС и скорости кровообращения. Можно предположить, что в осуществлении данного рефлекса могут участвовать функциональные элементы, чувствительные к недостатку кислорода. Целью проведенной работы являлось исследование изменений электрической активности изолированного сердца крысы в ответ на растяжение ПП в условиях гипоксии.

Эксперименты были проведены на изолированных сердцах крыс, перфузируемых по методу Лангендорфа. Аутбредных крыс (сток Wistar) (n = 10) массой 200–250 г наркотизировали (Золетил 100, Virbac Sante Animale, 35 мг/кг, в/б), затем изолированные сердца подвергались ретроградной перфузии раствором Кребса — Хензелейта (37 С°, 80 мм водного столба, pH 7,3–7,4), насыщенным карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2). Механическое растяжение ПП осуществлялось с помощью латексного баллончика. Условия гипоксии моделировались за счет перфузии сердца раствором, который не подвергался барботированию карбогеном. Действие гипоксии на состояние сердец подтверждалось биохимическим методом оценки соотношения концентраций молочной и пировиноградной кислот. Регистрация электрической активности сердца осуществлялась с помощью гибких мультиэлектродных матриц MEAFlex72, (Multichannel systems, Германия) с поверхности левого желудочка. В качестве показателей электрической активности оценивались продолжительность и коэффициент вариабельности (CV %) R—R интервалов, а также латентность электрических сигналов — временная задержка между моментами активации на двух выбранных электродах. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием критерия Шапиро — Уилка для проверки выборки на нормальность распределения и критерия Фридмана для повторных измерений ($p < 0,05$).

В результате ранее проведенных нами исследований было показано, что моделирование условий гипоксии или механического растяжения ПП по отдельности вызывало сокращение продолжительности R—R интервалов в изолированных сердцах. В данной работе сочетанное воздействие гипоксии и механического влияния не вызывало статистически значимых ($p < 0,05$) изменений продолжительности R—R в экспериментальной группе и провоцировало повышение вариабельности ритма сердечных сокращений. Наблюдаемое при растяжении ПП в условиях нормоксии увеличение электрической проводимости миокарда не было установлено при гипоксии.

В проведенном исследовании было показано, что рефлекторное усиление электрической активности сердца при растянутом ПП осложняется в условиях недостатка кислорода. Возможно, наблюдаемый эффект связан с усугублением работы механочувствительных ионных каналов, состояние которых зависит от кислотности среды и ионного баланса в клетках, изменяющихся при гипоксии.

© Е. Е. Харьковская, Г. В. Осипов, И. В. Мухина, 2021

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ КРОВИ НА ПЛАЗМЕННЫЙ ГЕМОСТАЗ

А. О. Цибулина[1], В. П. Демкин[1], В. В. Удут[2], Т. В. Руденко[1]

[1] Томский государственный университет
[2] НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

E-mail: aotsibulina1986@mail.ru

Аннотация

В работе проведено исследование динамики всего процесса гемокоагуляции методом низкочастотной пьезотромбоэластографии с использованием модели Уолберна и Шнека.

Плазменный гемостаз представляет собой процесс свертывания крови, сопровождаемый каскадом ферментативных реакций с участием белков плазмы от активации тромбина до образования фибринового сгустка. Несмотря на обилие эмпирической информации об устройстве и функционировании системы гемостаза, понимание механизмов этого процесса еще далеко от ясности. Плазменная система свертывания крови включает десятки различных белков, сложным образом взаимодействующих друг с другом и с клетками крови, в результате чего происходит изменение реологических свойств и агрегатного состояния крови от жидкого до вязкоупругого твердого. Детализация понимания процесса регуляции агрегатного состояния крови и получение новых фундаментальных знаний требуют дополнения существующей лабораторной парадигмы исследований методами математического моделирования процессов гемокоагуляции и определением физических механизмов изменения реологических свойств крови в процессе свертывания.

Интегральной характеристикой реологических свойств крови является вязкость [1].

В работах [2, 3] изложены физические основы метода низкочастотной пьезотромбоэластографии в условиях периодических сдвиговых напряжений для изучения вязкоупругих свойств цельной крови и его применения для диагностики гемостатического потенциала. Для учета вязких и упругих свойств крови мы использовали метод комплексного представления модуля вязкости $\eta^* = \eta' + i\eta''$, где η', η'' — коэффициент вязкости и коэффициент упругости, связанный с модулем сдвига $G' : \eta'' = \frac{G'}{\omega}$, где ω — частота сдвиговых напряжений.

В качестве реологической модели для определения зависимости коэффициента вязкости от скорости сдвиговых напряжений $\eta(\dot{\gamma})$ выбрана модель Уолберна и Шнека [4], в которой учитывается зависимость η от величины гематокрита и индекса ТРМА — концентрации фибриногена, одного из основных факторов свертывания крови, и глобулинов, отвечающих за иммунную систему.

$$\eta = C_1 e^{C_2 H_t} e^{C_4 \frac{TPMA}{H_t^2}} \dot{\gamma}^{-C_3 H_t},$$

где $C_1 = 0{,}000797$ Pa · s, $C_2 = 0{,}0608$, $C_3 = 0{,}00499$, $C_4 = 14{,}585$ l/g, $TPMA = 25$ g/l.

С использованием данной модели проведено исследование динамики всего процесса гемокоагуляции, от начальных этапов зарождения сгустка (фазы инициации/амплификации) до его лизиса, методом низкочастотной пьезотромбоэластографии [4].

Показано, что учет химического состава плазмы дает вклад в динамику вязкоупругих характеристик крови в процессе коагуляции.

Литература

1. Тютрин И. И., Удут В. В. Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета. 2016. 170 с.

2. Демкин В. П., Мельничук С. В., Удут В. В., Тютрин И. И, Демкин О. В. Физические принципы метода низкочастотной пьезотромбоэластографии для изучения реологических свойств цельной крови // Изв. вуз. Физика. 2019. Т. 62, № 6. С. 47–56.

3. Демкин В. П., Мельничук С. В., Руденко Т. В., Тютрин И. И, Удут В. В. Исследование вязкоупругих характеристик жидкости методом низкочастотной пьезоэластографии // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2019. Т. 168, № 9. С. 391–396.

4. Cowan A. Q., Cho D. J., Rosenson R. S. Importance of Blood Rheology in the Pathophysiology of Atherothrombosis // Cardiovasc. Drugs Ther. 2012. Vol. 26. P. 339–348. DOI 10.1007/s10557-012-6402-4.

© А. О. Цибулина, В. П. Демкин, В. В. Удут, Т. В. Руденко, 2021

ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА P53 ОТ ПОЯВЛЕНИЯ ТЕМНЫХ НЕЙРОНОВ В ГИППОКАМПЕ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ СЕПТОПЛАСТИКИ

С. С. Шилин[1], М. Г. Костяева[1], И. В. Кастыро[1], Т. Ю. Юнусов[2], Т. А. Коломин[3], В. И. Торшин[1], В. И. Попадюк[1], С. Г. Драгунова[1], В. К. Клейман[1], Н. Д. Кузнецов[1], П. А. Сломинский[3]

[1] Российский университет дружбы народов, Москва
[2] Городская клиническая больница № 40 ДЗМ, Москва
[3] Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва

E-mail: 9060965527@mail.ru

Аннотация

Было проведено исследование зависимости экспрессии белка p53 от появления темных нейронов в гиппокампе у крыс при экспериментальном моделировании септопластики. Моделирование проводили путем скарификации слизистой оболочки перегородки носа. Изучали пирамидный слой субполей гиппокампа CA1, CA2, CA3 и зубчатую извилину (DG). Пик роста экспрессии белка p53 в цитоплазме пирамидного слоя CA1 и CA2 гиппокампа пришелся на 2–4-е сутки после операции, в CA3 — на всех сроках после хирургического вмешательства, в DG количество p53-позитивных нейронов было значительно выше на всех сроках оценки. При сопоставлении данных была обнаружена положительная сильная связь на всех сроках оценки и во всех субполях гиппокампа.

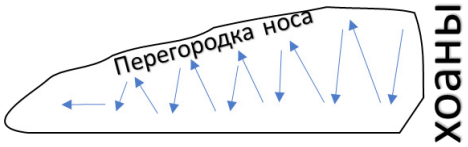


Рис. 1. Схема проведения моделирования септопластики; стрелками указано направление скарификации слизистой перегородки носа

В исследовании оценивается зависимость экспрессии белка p53 от появления темных нейронов (ТН) в гиппокампе у крыс при экспериментальном моделировании септопластики (рис. 1). На 15 половозрелых крысах-самцах линии Wistar было проведено моделирование септопластики. Изучены гистологические срезы гиппокампа, окрашенные толуидиновым синим по Нисслю и антителами к белку p53. В субполе CA1 (рис. 2) количество p53-позитивных нейронов достоверно повысилось на 2-й, 4-й ($p < 0{,}001$) и 6-й дни ($p < 0{,}05$). В динамике пик роста экспрессии белка p53 в цитоплазме нейронов CA1 и CA2 пришелся на 2–4-е сутки после операции, а на 6-й день количество этих нейронов снизилось ($p < 0{,}001$). В цитоплазме нейронов CA3 на всех сроках после хирургического вмешательства было отмечено увеличение экспрессии белка p53 по сравнению с контрольной группой. В пирамидном слое CA1 количество ТН на 6-й день снизилось ($p < 0{,}001$). В CA2 через двое суток был отмечен минимум ТН по сравнению с 4-м днем ($p < 0{,}001$). В CA3 на 4-й день наблюдался пик ТН по сравнению с остальными днями ($p < 0{,}001$) (рис. 3). Была обнаружена положительная сильная связь на всех сроках оценки и во всех субполях гиппокампа между ростом количества темных и p53-позитивных нейронов (рис. 4). Появле-

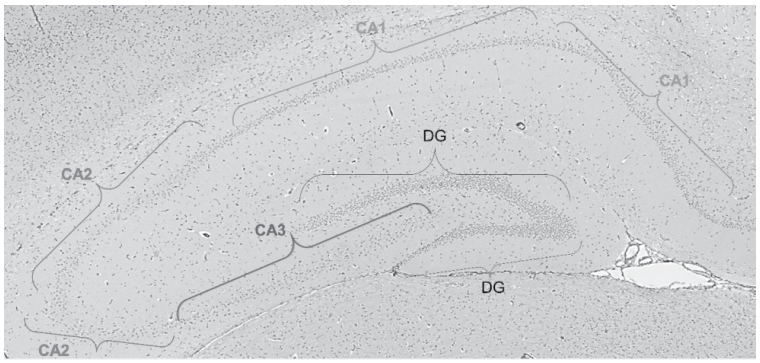


Рис. 2. Расположение субполей гиппокампа (CA1, CA2, CA3) и зубчатой извилины (DG) крысы. Иммуногистохимическая реакция анти-p53 с докрашиванием гематоксилином Майера. Ув. × 100

© С. С. Шилин, М. Г. Костяева, И. В. Кастыро, Т. Ю. Юнусов, Т. А. Коломин, В. И. Торшин, В. И. Попадюк, С. Г. Драгунова, В. К. Клейман, Н. Д. Кузнецов, П. А. Сломинский, 2021

ние темных и p53-позитивных нейронов в гиппокампальной формации у крыс после моделирования септопластики является типовыми ответными реакциями нервной ткани на стресс. Экспрессия белка p53 связана с базофилией цитоплазмы нейронов. Предположительно белок p53 может запускать не только активацию поврежденных нейронов в гиппокампе, но и играть нейропротективную роль. Предстоящие исследования должны определить роль белка p53 в дальнейшей судьбе поврежденных нейронов в пирамидном слое и дифференцировать механизмы его экспрессии.

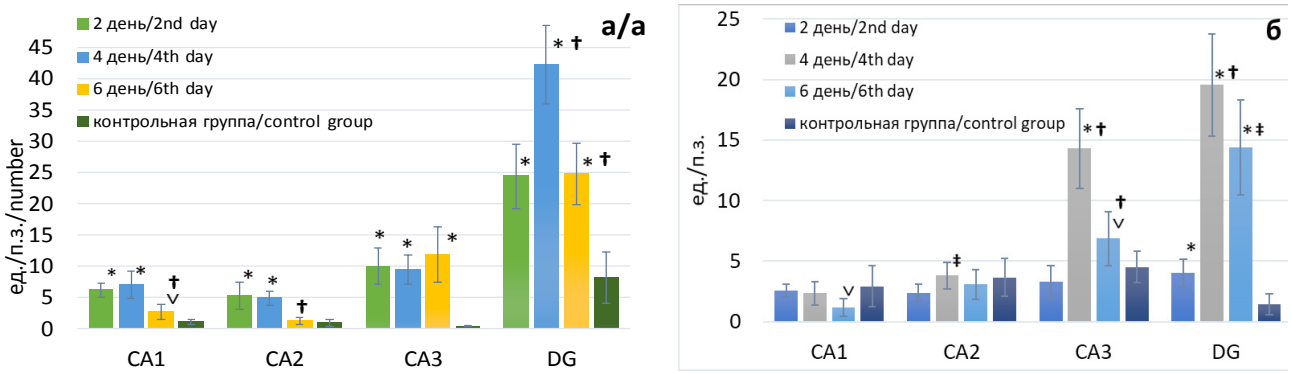


Рис. 3. Динамика изменения количества p53-позитивных нейронов (p53) (*а*) и темных нейронов (*б*) при моделировании септопластики

Примечание. * — достоверные различия между данными контрольной группы и сроками после операции ($p < 0{,}001$); ᵛ — достоверные различия между данными контрольной группы и сроками после операции ($p < 0{,}05$); † — достоверные различия между сроками после операции внутри экспериментальной группы ($p < 0{,}001$); ‡ — достоверные различия между сроками после операции внутри экспериментальной группы ($p < 0{,}05$).

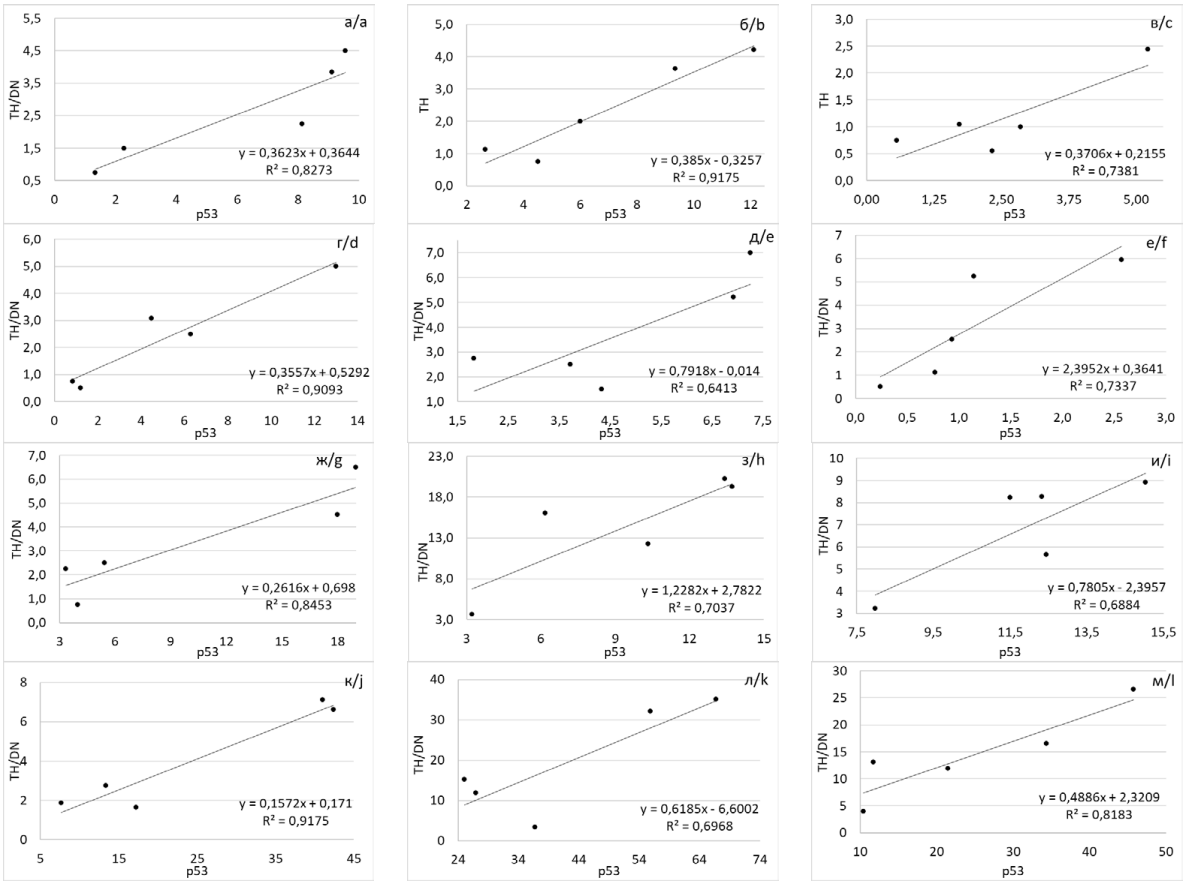


Рис. 4. Корреляция между количеством темных нейронов (TH) и количеством p53-позитивных нейронов (p53) в субполях гиппокампа CA1 (а–в), CA2 (г–е), CA3 (ж–и) и DG (к–м) на 2-й (а, г, ж, к), 4-й (б, д, з, л) и 6-й (в, е, и, м) день после моделирования септопластики

РАЗДЕЛ 3

ВИРУСОЛОГИЯ

I

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННЫХ В ЧАСТНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ И КРУПНОМ ЖИВОТНОВОДЧЕСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Д. А. Бабошко[1], И. П. Осипова[1], В. Е. Екушов[1], А. И. Кузьмин[2], О. А. Рожков[2], А. В. Тотменин[1], М. В. Флеер[2], Н. М. Гашникова[1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Управление ветеринарии Коченёвского района, Коченёво*

E-mail: baboshko_da@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе представлены данные о распространенности и разнообразии вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) в Коченёвском р-не Новосибирской области. Исследовано 317 образцов крови коров из частных подворий и крупного животноводческого хозяйства. В 191 образце была выявлена ДНК ВЛКРС. Для каждого из них получены и расшифрованы вирусспецифичные участки генома (env). Сравнительный филогенетический анализ образцов ВЛКРС позволил выявить особенности распространения отдельных генотипов вируса в данном регионе.

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) вызывает энзоотический лейкоз крупного рогатого скота. Это заболевание широко распространено в разных странах мира, занимает первое место среди инфекционных болезней крупного рогатого скота. Высокая распространенность ВЛКРС среди особей в отдельных регионах может приводить к потере ценных племенных пород скота, снижению молочной продуктивности и продолжительности жизни. Не исключается возможность роли ВЛКРС в качестве онкогенного агента при возникновении рака молочной железы у женщин.

Цель исследования

Провести сравнительный анализ поражения поголовья скота ВЛКРС и распределения генотипов вируса в частных подворьях и крупном животноводческом хозяйстве Коченёвского р-на Новосибирской области.

Материалы / методы

Исследовано 317 образцов крови коров из частных подворий и из предприятия молочного животноводства ООО «Раздольное» Коченёвского р-на Новосибирской области. С помощью лабораторного набора праймеров получены, расшифрованы и исследованы фрагменты ВЛКРС протяженностью 1000 п.н., кодирующие область гена env.

Результаты

Из 117 образцов, собранных в частных подворьях пяти населенных пунктов, положительными по ПЦР-анализу оказались 48 проб. Обнаружены существенные отличия в поражении коров в населенных пунктах: выяв-

© Д. А. Бабошко, И. П. Осипова, В. Е. Екушов, А. И. Кузьмин, О. А. Рожков, А. В. Тотменин, М. В. Флеер, Н. М. Гашникова, 2021

ляемость ВЛКРС варьировала от 0 до 87 % и носило очаговый характер. Для 200 образцов, собранных в животноводческом хозяйстве, положительными на ВЛКРС были 143 пробы (72 %), что говорит о достаточно большом поражении скота.

Филогенетический анализ позволил отнести 162 исследованных ВЛКРС к генотипу 4, 29 вариантов вируса — к генотипу 7. В одном населенном пункте, в частных подворьях, был обнаружен только 7-й генотип ВЛКРС, а 4-й генотип был широко распространен в остальных населенных пунктах. В молочном хозяйстве присутствовал как 7-й генотип, так и 4-й в соотношении 17 : 126, соответственно. Анализ нуклеотидных последовательностей ВЛКРС, включающий образцы из Европы, Америки и выделенные на территориях России, позволил заключить, что среди изученных образцов из частных подворий выделяется несколько отдельных кластеров генетически близких вирусов (с бутстрепом выше 75), относящихся к 4 и 7 генотипам. Для животноводческого хозяйства таких кластеров не наблюдается.

Выводы

В Коченевском районе НСО циркулируют 4 и 7-й генотипы ВЛКРС, первый из них значительно преобладает. В Коченевском районе существует несколько путей заноса ВЛКРС, причем для частных подворий прослеживаются цепочки распространения инфекции. Для каждого населенного пункта был характерен определенный генотип ВЛКРС, тогда как в хозяйстве присутствовал как 4-й, так и 7-й генотип вируса. Результаты данного исследования подтверждают актуальность молекулярно-генетических исследований ВЛКРС для разработки эффективных мероприятий по оздоровлению и мониторингу не только для крупных сельхоз предприятий, но и частных подворий крупного скота в России.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТЕЛЛУРСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

П. М. Бадриева[3], А. А. Адиева[1,4], Г. М. Абакаров[2], К. С. Бекшоков[3], М. А. Меджидов[4], М. Г. Меджидова[4]

[1]*Прикаспийский институт биологических ресурсов — обособленное подразделение Дагестанского федерального исследовательского центра РАН*
[2]*Дагестанский технический университет, Махачкала*
[3]*Дагестанский государственный университет, Махачкала*
[4]*Дагестанский государственный университет народного хозяйства, Махачкала*

E-mail: adieva-m@mail.ru

Аннотация

Проведен сравнительный анализ цитотоксических и противовирусных свойств синтезированных производных теллура в модельных клеточных системах инфекций, вызванных вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом. При изучении 4 теллурорганических соединения с использованием первичных и перевиваемых культур клеток в различных схемах заражения для каждой изученной биологической модели были выявлены различные пороги концентрации цитотоксичности ($ОЦД_{50}$ и $ЦД_{50}$). Показано, что производные теллура с метоксифенил и этоксифенил этеном проявляют вируснейтрализующую активность, предотвращая проникновение вирионов вируса простого герпеса в чувствительные клетки. ХТИ для данных соединений составил 84 и 77, соответственно. Проявление цитотоксического эффекта всех теллурсодержащих органических соединений для перевиваемых клеток лежит в более низкой концентрации, чем для первичных клеток.

Герпесвирусные инфекции (ГВИ), вызванные ВПГ и ЦМВ широко распространены в человеческой популяции и являются важной медико-социальной проблемой современного здравоохранения [1, 3].

Основные методы медикаментозного лечения ГВИ направлены на подавление репродукции герпес вирусов в инфицированном организме. Известные специфические противовирусные препараты (ацикловир, ганцикловир и их аналоги), используемые для лечения ГВИ, имеют ряд недостатков. К наиболее существенным можно отнести токсичность и резистентность вирусов, которая развивается при длительном применении и при рекуррентных заболеваниях [2,4]. В связи с этим актуальной задачей является поиск новых соединений, перспективных для разработки препаратов против герпес вирусных инфекций человека, различающихся механизмами действия и подавляющих ВПГ 1/2 и ЦМВ как дикого типа, так и мутантные лекарственно-устойчивые штаммы.

На кафедре химии ФГ БОУ ВО «Дагестанского государственного технического университета» синтезирован ряд новых теллурсодержащих соединений и показано, что при введении некоторых из них лабораторным животным наблюдается усиление интенсивности свободно радикальных процессов в периферической крови и в печени. Представляло интерес выяснить, окажут ли влияние вновь синтезированные соединения на развитие герпес вирусных инфекций в клетках животных и человека.

Цель настоящей работы состояла в изучении цитотоксического эффекта 4-х производных теллура в культуре первичных и перевиваемых клеток, а также противовирусных свойств в отношении инфекций, вызванных ВПГ1 и ЦМВ.

Культура клеток и вирусы**.** В работе использовали перевиваемую линию эпителиальных клеток почек зеленой мартышки — Vero и первичную культуру диплоидных фибробластов эмбрионов человека — ФЭЧ, полученные из коллекции клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ России. Референс-штаммы ВПГ и ЦМВ были получены из коллекции вирусов при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ России.

Вещества. Изучены противовирусные свойства теллурсодержащих органических веществ:

1) [3-метилбензотеллуразол-2] [4-диметиламинобензо] триметинцианйодид (вещество 1);
2) [3–метилбензотеллуразол-2] [1-метилхинолин-2] триметинцианйодид (вещество 2);
3) [2-бензотеллуразолил–2] [4- метоксифенил] этен (вещество 3);
4) [2-бензотеллуразолил–2] [4- этоксифенил] этен (вещество 4).

При исследовании биологической активности синтезированных теллурсодержащих гетероциклов ставилась задача возможного изучения влияния различных радикалов, содержащихся как в ароматическом кольце, так и в гетерокольце. При изучении противовирусных свойств исследуемых соединений в качестве положительного контроля использовали сертифицированные препараты, включенные в протоколы лечения инфекций, использованных в данной работе в качестве модельных ГВИ — ВПГ 1 — ацикловир, ЦМВ — ганцикловир. АЦВ, Зовиракс — «ГлаксоСмитКляйн Вэллком», Великобритания; ГЦВ, Цимевен — «Хоффман-ЛяРош», Швейцария.

© П. М. Бадриева, А. А. Адиева, Г. М. Абакаров, К. С. Бекшоков, М. А. Меджидов, М. Г. Меджидова, 2021

Цитотоксичность теллурсодержащих гетероциклов определяли по влиянию на жизнедеятельность клеток Vero и ФЭЧ, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего и методом МТТ. Острую цитотоксичность ($ОЦД_{50}$), вызывающую гибель 50 % клеток определяли через 24 часа после внесения различных концентраций гетероциклических соединений теллура. Хроническую токсичность ($ЦД_{50}$) оценивали через 72 часа после внесения соединений.

Противовирусную активность соединений определяли с использованием 4-х схем воздействия: профилактическая, которая моделирует профилактическое воздействие — 1-я схема; микробицидная, моделирует экстренное профилактическое воздействие — 2-я схема; лечебная, моделирует терапевтическое действие — 3-я схема и вирулицидная, характеризует способность соединений нейтрализовать вирус и / или инфекционную активность вируса — 4-я схема. Во всех схемах положительным контролем были АЦВ и ГЦВ использованные в концентрациях 10 и 5 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали инфицированную ВПГ 1 и ЦМВ культуру клеток без исследуемых веществ. Противовирусную активность изученных соединений *in vitro* оценивали методом модифицированных бляшек, который проводили путем подсчета количества инфицированных клеток (бляшек) в опыте и в контроле. Степень ингибирования бляшкообразования, т. е. цитопатогенного действия, рассчитывали по формуле Спирмана – Кербера. Значения 50 % ингибирующей дозы гетероциклических соединений теллура, исследованных в данной работе, рассчитывали методом линейной регрессии. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) рассчитывали, как отношение 50 % цитотоксической дозы к 50 % ингибирующей дозы.

Результаты

Цитотоксичность соединений. При определении хронической цитотоксичности соединения использовались в различных концентрациях (от 0,1 до 500 мкг/мл). Значения $ЦД_{50}$ для культуры клеток Vero значительно различались и составили от 0,7 до 160 мкг/мл. Цитотоксичность для клеток ФЭЧ ($ЦД_{50}$), также варьировала, от 5,9 до 316,0 мкг/мл. Данные представлены в таблице. Поскольку вещества проявили выраженный антипролиферативный эффект для сравнения приведены данные по цитотоксическому действию доксорубицина, антрациклинового антибиотика, широко используемого для лечения рака молочной железы и гематологических злокачественных новообразований. Для сравнения $ЦД_{50}$ для препарата ацикловир и ганцикловир, включенные в протоколы лечения инфекции, вызванных ВПГ и ЦМВ равны 1000 и 125 мкг/мл, соответственно.

Цитотоксического действие 24 и 72-х часового лечения теллурсодержащими органическими веществами различных клеточных линий

Вещества	Культура клеток					
	ФЭЧ		Vero		Эритроциты, мг/мл	Клетки печени, мг/мл
	$ЦД_{50}$, мкг/мл	$ОЦД_{50}$, мкг/мл	$ЦД_{50}$, мкг/мл	$ОЦД_{50}$, мкг/мл		
Вещество 1	146,8	147,8	3,5	6,5	> 100	> 100
Вещество 2	5,9	7,3	0,7	0,9	> 100	> 100
Вещество 3	306,3	577,2	160	180	> 300	> 100
Вещество 4	316,0	433,6	153	157	> 300	> 100
Доксорубицин	0,19	0,24	0,02	0,03	н/и	н/и

Статистический анализ показал, что значение $ЦД_{50}$ для соединений 3 и 4 значительно больше по сравнению с таковым для соединений 1 и 2 в отношении культуры клеток Vero и ФЭЧ ($P<0,001$), что свидетельствует о более низкой цитотоксичности данных соединений.

Для определения острой цитотоксичности в отношении клеток ФЭЧ и Vero теллурсодержащие органические соединения использовали в более высоких концентрациях (от 1 мкг/мл до 1 мг/мл). Значения $ОЦД_{50}$, которые были определены через 24 часа после внесения исследуемых веществ для клеток Vero варьировали от 0,9 до 180 мкг/мл, для диплоидных фибробластов человека от 7,3 до 577,2 мкг/мл. В данной схеме обработки, также, вещества 3 и 4 показали меньшую цитотоксичность в отношении обеих культур клеток ($P<0,005$).

Определение токсического действия соединений в отношении ФЭЧ и Vero показало, что наибольшим токсическим действием обладает соединение 2 — [3-метилбензотеллуразол-2] (1-метилхинолин-2] триметилцианйодид. Для этого соединения были зафиксированы крайне низкие нетоксичные концентрации. Так, $ОЦД_{50}$ и $ЦД_{50}$ в первичной культуре составили 7,3 и 5,9 мкг/мл, а для перевиваемой культуры — 0,9 и 0,7 мкг/мл. Соединение 1 – [3-метилбензотеллуразол-2] [4-диметиламинобензо] триметилцианйодид вызывало 50 % гибель клеток ФЭЧ на третьи сутки в концентрации 146,8 мкг/мл, для клеток Vero $ЦД_{50}$ составил 3,5 мкг/мл. Если сравнить данные по $ЦД_{50}$ для ФЭЧ, то этот показатель сходен с аналогичными данными для ганцикловира, эталонного препарата

при лечении ЦМВИ. Надо отметить, что концентрации соединений 1 и 2, вызывающая гибель 50 % клеток первичной и перевиваемой культур при острой и хронической цитотоксичности практически не отличалась.

Наименьшее цитотоксическое действие проявляли соединения 3 и 4 — (2-бензотеллуразолил) — 2-(4-метоксифенил) этен и (2-бензотеллуразолил) — 2-(4-этоксифенил) этен. Так, $ОЦД_{50}$ для веществ 3 и 4 в культуре клеток Vero были равны 180 и 157 мкг/мл, $ЦД_{50}$ — 160 и 153 мкг/мл, соответственно. Для фибробластов человека $ОЦД_{50}$ превышали 400 мкг/мл и составили для 2-бензотеллуразолил — 2-(4-метоксифенил) этена (вещество 3) — 577,2 и 433,6 мкг/мл для 2-бензотеллуразолил — 2-(4-этоксифенил) этена (вещество 4). Токсическая доза через 72 часа обработки ($ЦД_{50}$) составила более 300 мкг/мл для обеих соединений (см. таблицу).

Цитотоксические эффекты 24 и 72-х часового лечения теллурсодержащих веществ, изученные на двух линиях клеток *in vitro* (первичные ФЭЧ — диплоидные фибробласты человека и перевиваемые Vero — клетки почек зеленой мартышки) показали, что они сравниваются с таковыми для доксорубицина. Концентрации веществ $ЦД_{50}$ и $ОЦД_{50}$ для трансформированных клеток значительно ниже, чем для первичных клеток человека. Параллельно проведенное исследование токсичности данных соединений на крысах не выявило острой цитотоксичности в тех концентрациях, которые были введены животным. Дальнейшее исследование хронической цитотоксичности *in vivo* (эритроциты и клетки печени) показало, что она не обусловлена неспецифическим повреждением клеточных мембран, так как гемолитический потенциал в эритроцитах наблюдался при значительно более высокой концентрации.

Исследование противовирусных свойств соединений **in vitro.** Противовирусную активность синтезированных производных теллура в отношении ВПГ-инфекции изучали путем внесения различных концентраций веществ (от 0,1 до 10 мкг/мл) в 4-х схемах воздействия, описанных в разделе «Материалы и методы». Анализ значений ИД50 и ХТИ для каждого соединения показало, что два из них [2-бензотеллуразолил-2] [4-метоксифенил] этен (вещество 3) и [2-бензотеллуразолил-2] [4-этоксифенил] этен (вещество 4) проявили активность в вирулицидной схеме воздействия со значением ХТИ равным 84 и 77. Для двух других соединений (вещества 1 и 2) значения ХТИ оказались низкими в связи с высокой цитотоксичностью, проявленной в отношении клеток Vero. Определение противовирусных свойств соединений *in vitro* в отношении ЦМВ-инфекции во всех изученных схемах не дало положительного эффекта.

Таким образом, изучение цитотоксичности 4-х производных теллура показало, что в больших концентрациях все соединения проявляют выраженную цитотоксичность, однако биологический эффект зависит от радикала, присоединенного к теллуру. Цитотоксическая доза изученных веществ была на два порядка ниже, чем для известного противоопухолевого препарата доксорубицин (от 0,7 до 160 мкг/мл против 0,02 мкг/мл), в первичных клетках ФЭЧ эта концентрация была еще ниже (5,9–316 мкг/мл). Существенным является то, что гемолитический потенциал эритроцитов наблюдался при очень высоких концентрациях (100–300 мг/мл), поэтому цитотоксичность изученных веществ нельзя отнести к неспецифическому повреждению клеточных мембран. Природа цитотоксического эффекта теллурорганических соединений требует дальнейшего детального изучения, также, в связи с исследованиями последних лет [5, 6], показывающими различные механизмы индукции клеточной гибели при различных концентрациях другого гетероциклического соединения –дифенил дителлурида.

Изучение противовирусной активности исследуемых веществ в стандартной лечебной схеме против ВПГ и ЦМВ не обладало терапевтической эффективностью, однако, в отношении ВПГ-инфекции были получены интересные результаты относительно вируснейтрализующей активности соединений. Все изученные соединения обладали вируснейтрализующей активностью, но только включение в структуру метокси- и этокси-групп позволило повысить порог токсичности для клеток и рассчитать химиотерапевтический индекс для веществ 3 и 4, который делает их перспективными соединениями для разработки комбинированных препаратов при лечении вирусных заболеваний, вызванных ВПГ.

Литература

1. Looker K. J., Johnston C., Welton N. J. et al. The global and regional burden of genital ulcer disease due to herpes simplex virus: a natural history modelling study // BMJ Glob Health., 2020, Mar 8; 5(3):e001875. doi: 10.1136/bmjgh-2019-001875.

2. Koch M. S., Lawler S. E., Chiocca E. A. HSV-1 Oncolytic Viruses from Bench to Bedside: An Overview of Current Clinical Trials. Cancers, 2020. Vol. 12(12), 3514; https://doi.org/10.3390/ cancers12123514.

3. Адиева А. А. Герпесвирусные инфекции и перинатальная патология // Российский педиатрический журнал. 2010. № 1. С. 39–44.

4. Zinser E., Krawczyk A., MühlZurbes P., Aufderhorst U., Draßner C., Stich L. et.al. New Promising Candidate to Overcome Drug Resistant Herpes Simplex Virus Infections. Antiviral Res. 2018. No 149. P. 202–210.

5. Kim Y. J., Lee D. H., Choi Y. S., Jeong J. H., Kwon S. H. Benzo[b]tellurophenes as a Potential Histone H3 Lysine 9 Demethylase (KDM4) Inhibitor. Int J Mol Sci., 2019, Nov 25, 20(23):5908. doi: 10.3390/ijms20235908.

6. Trindade C., Juchem A., Guecheva T. N., de Oliveira I. M., Dos Santos Silveira P. et.al. Diphenyl Ditelluride: Redox-Modulating and Antiproliferative Properties. Oxid. Med. Cell. Longev. 2019, Oct 24;2510936. doi: 10.1155/2019/2510936.

МОДЕЛЬ ТАРГЕТНОГО ВИРОЛИЗИСА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

М. Д. Бочкарева, И. Р. Иматдинов

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

E-mail: bochkareva_md@vector.nsc.ru

Аннотация

Разработана вирус-клеточная модель таргетного виролизиса ВИЧ-инфицированных клеток. Одним из компонентов модели являются трансгенные клеточные линии, имитирующие поверхностную структуру ВИЧ-инфицированных клеток. Вторым — рекомбинантные штаммы вируса везикулярного стоматита, экспонирующие на поверхности вирионов рецепторы CD4 и CCR5 или CD4 и CXCR4. Полученные вирусы rVSV_mNG_CD4CCR5 и rVSV_mNG_CD4CXCR4 инфицируют только клеточные линии, экспонирующие на своей поверхности gp161(gp120/41) ВИЧ1.

По данным UNAIDS за 2020 г. количество ВИЧ-инфицированных людей во всем мире достигло 37,7 млн человек, а в Российской Федерации за 2021 г. зарегистрировано 1 528 356 человек с подтвержденным диагнозом «ВИЧ-инфекция», при этом охват лечением составляет 54,6 % от этого числа (справка на 30 июня 2021 г. ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Для ВИЧ-инфицированных пациентов ВОЗ рекомендовало использование антиретровирусной терапии (АРВТ), но ключевой проблемой, снижающей эффективность ее применения, является возрастающая резистентность циркулирующих ВИЧ к существующим препаратам. В случае резистентных к препаратам изолятов вируса применение АРВТ становится неэффективным и количество Т-лимфоцитов в крови стремительно снижается, развивается СПИД. В связи с этим существует потребность в разработке дополнительных подходов к комбинированной терапии ВИЧ-инфекции.

Одним из перспективных направлений являются генно-инженерные векторные системы для таргетной элиминации ВИЧ-инфицированных клеток. Целью данной работы являлась разработка безопасной вирус-клеточной модели (см. рисунок) и изучение с ее использованием таргетного виролизиса клеток, экспонирующих на своей поверхности gp161 ВИЧ-1.

А — взаимодействие ВИЧ-1 с CD4+ клетками при ВИЧ-инфекции; Б — схема вирус-клеточной модели взаимодействия рекомбинантного вируса и ВИЧ-инфицированной клетки

С использованием методов обратной генетики получены репликационнодефектные вирусы везикулярного стоматита rVSV_mNG_CD4CCR5 и rVSV_mNG_CD4-CXCR4, механизм действия которых заключается в функциональной эксплуатации поверхностного гликопротеина gp161 ВИЧ-1 в качестве белка слияния вирус-клеточных билипидных мембран. Рекомбинантные вирусы rVSV_mNG_CD4-CCR5 и rVSV_mNG_CD4CXCR4 не имеют белков слияния и способны проникать в клетку только через связывание с gp161 на поверхности инфицированных клеток. При этом гликопротеин gp161 экспонируется на поверхности ВИЧинфицированных клеток в результате жизненного цикла вируса иммунодефицита человека.

Для культивирования и изучения рекомбинантных вирусов были получены трансгенные линии клеток HEK293_EnvX4 и HEK293_EnvR5, экспонирующие на своей поверхности функциональные гликопротеины gp161 ВИЧ-1 R5 или X4 тропности. Такой подход обеспечил функциональную стабильность трансгенов mNG_CD4-CCR5 и mNG_CD4CXCR4 в структуре рекомбинантных вирусов, а также позволил обезопасить проведение исследований.

Показано, что при инфицировании монослоя клеток HEK293, HEK293_Env_X4 или HEK293_Env_R5 рекомбинантным вирусом rVSV_mNeonGreen [CD4-CCR5] или rVSV_mNeonGreen [CD4-CXCR4], вирусы проявляют R5 или X4 тропизм в отношении гликопротеинов gp161 и не инфицируют клетки, не имеющие gp161 ВИЧ-1. Инфицирование трансгенных клеток рекомбинантными вирусами соответствующей тропности приводит к формированию характерных цитопатических изменений в виде обширного синцития и последующей деструкции монослоя клеток.

Разработанная вирус-клеточная модель используется для фундаментальных исследований коэволюции лиганд-рецепторных взаимодействий ВИЧ-1 с ключевыми клеточными мишенями, что позволит создать подходы для разработки новых терапевтических препаратов, обеспечивающих специфичный клиренс посредствам виролизиса ВИЧ-инфицированных клеток.

© М. Д. Бочкарева, И. Р. Иматдинов, 2021

ЗНАЧЕНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРОГНОЗЕ БЕЗМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО*

К. А. Гаптулбарова, Е. О. Родионов, М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, И. А. Цыденова, М. М. Цыганов

Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук

E-mail: Xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Аннотация

На сегодняшний день вопрос о значении вируса папилломы человека (ВПЧ) в возникновении и развитии рака легкого остается открытым. Имеющиеся опубликованные литературные данные в силу противоречивости полученных результатов не дают убедительных доказательств участия ВПЧ в патогенезе данной онкопатологии. В России же исследований, касающихся определения роли данного вируса в канцерогенезе РЛ, не встречается вовсе.

Материалы и методы

В исследование включено 109 больных первично-операбельным немелкоклеточным раком легкого IIB-IIIA стадии центральной и периферической локализации в возрасте 39–76 лет (60,8 ± 1,02). В качестве материала исследования были использованы операционные образцы нормальной и опухолевой ткани легкого (~60–70мм^3), а также цельная кровь на каждого пациента. ДНК из полученных образцов выделяли при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Определяли наличие ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59-го генотипов. Для дополнительного подтверждения и проверки наличия ВПЧ использовалась цифровая ПЦР (Droplet Digital PCR-Система ddPCR QX200, Bio-Rad, USA). Результат анализировался с использованием программного обеспечения QuantaSoft™ 1.7.4.0917. Оценку выживаемости проводили по методу Каплана — Майера. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера.

Результаты

В результате проведенного исследования ВПЧ был обнаружен у 17,4% пациентов (19 из 109 случаев). Моно- и микст-инфицирование наблюдалось у 13 и 6 больных (68,4% и 31,6%) соответственно.

Проведение типирования ВПЧ ВКР у больных показало наличие 7 типов искомого вируса: 16, 18, 31, 35, 51, 52, 56 (рис. 1). Нетипичным является то, что большинство ВПЧ-положительных образцов идентифицировано в крови исследуемых пациентов (10 случаев) с наличием в ней 16, 18, 51 и 56-го типов вируса (см. рис. 1).

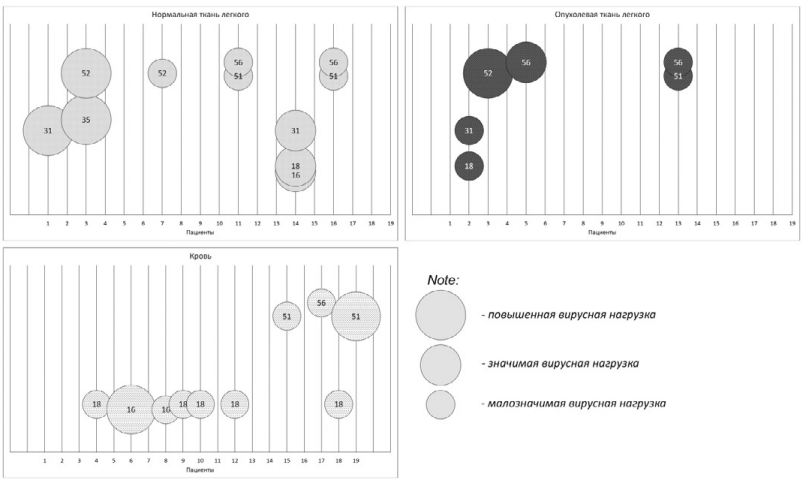


Рис. 1. Типы вируса папилломы человека и вирусная нагрузка у ВПЧ-позитивных больных первично-операбельным немелкоклеточным раком легкого в зависимости от исследуемого материала

Установлено, что в исследуемых ВПЧ-позитивных образцах преимущественно наблюдалась малозначимая вирусная нагрузка, 68,4% (13/19 случаев). Повышенная (5/19 случаев, 26,3%) и значимая (2/19 случаев, 10,5%) чаще встречалась у пациентов с ВПЧ в образцах нормальной ткани легкого.

В зависимости от инфицированности ВПЧ пациентов разделили на две группы наблюдения: ВПЧ-позитивные (n = 19) и ВПЧ-негативные (n = 90). Проводилась оценка безметастатической выживаемости больных РЛ в зави-

© К. А. Гаптулбарова, Е. О. Родионов, М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, И. А. Цыденова, М. М. Цыганов, 2021

* Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00023.

симости от инфицированности ВПЧ ВКР. Обнаружено, что у ВПЧ-позитивных пациентов наблюдается 100%-я пятилетняя безметастатическая выживаемость по сравнению с ВПЧ-отрицательными пациентами (73 %; рис. 2).

Выводы

В результате проведенного исследования были получены данные о частоте распространения ВПЧ ВКР среди больных немелкоклеточным раком легкого, определена вирусная нагрузка у ВПЧ-позитивных пациентов для ВПЧ-позитивных больных. Для ВПЧ-позитивных больных определена 100%-я безметастатическая выживаемость. Следует провести дальнейшие исследования и обратить пристальное внимание на определение наличия ВПЧ как на маркер благоприятного исхода при раке легкого.

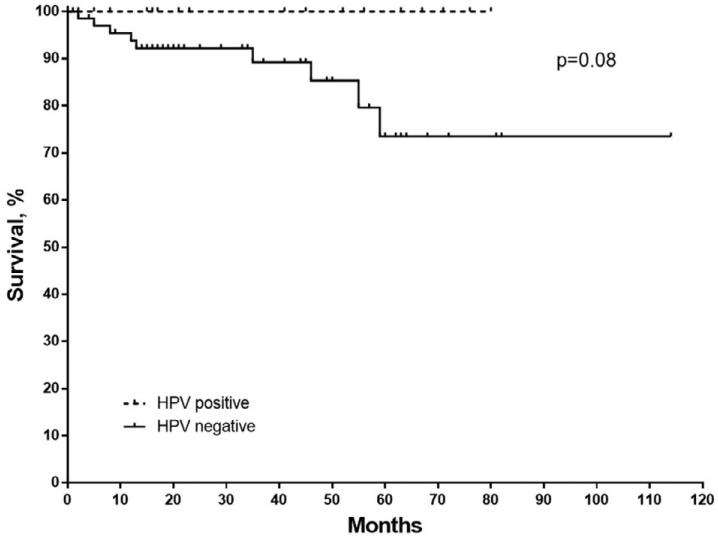


Рис. 2. Безметастатическая выживаемость ВПЧ-позитивных и ВПЧ-негативных больных РЛ

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР 5'-3' UTRS НОВОГО МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ВИРУСА KINDIA TICK VIRUS

А. А. Гладышева[1,2], А. В. Гладышева[1], В. А. Терновой[1], В. Б. Локтев[1]

[1] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
[2] Новосибирский государственный университет

E-mail: a.gladysheva1@g.nsu.ru

Аннотация

Kindia tick virus (KITV) — новый многокомпонентный вирус группы Jingmenvirus (JMTV), переносимый клещами и патогенный для человека. В ходе данного исследования были получены и характеризованы полногеномные последовательности двух штаммов KITV, определены длины отдельных сегментов и 5'–3' нетранслируемых областей генома (UTRs). Предсказаны и проанализированы вторичные структуры 5'–3' UTRs, что позволило сформулировать гипотезу о роли элементов UTRs в репликации вирусной РНК.

Kindia tick virus (KITV) — вирус группы Jingmenvirus (JMTV) принципиально отличается от «классических» флавивирусов наличием многокомпонентного сегментированного (+) ssRNA генома. Геном KITV распределен на 4 сегмента, причем каждый сегмент генома упакован в отдельную вирусную частицу. Сегменты 1–3 несут по одной протяженной открытой рамки считывания (ORF), а сегмент 4 обладает двумя ORF. Каждый сегмент генома помимо ORF имеет характерные 5'–3' UTRs. Вирусы группы JMTV обнаружены в Азии, Европе, Америке и Африке. Недавно, опубликованы первые сообщения об обнаружении этих вирусов на территории России и их патогенности для человека. Широкое распространение этих новых патогенов представляет потенциальную угрозу для здоровья человека.

В данном исследовании выполнен анализ геномов двух штаммов KITV, обнаруженных в клещах на территории Гвинейской республики в 2018 г. Полногеномные последовательности двух штаммов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 депонированы в GenBank под номерами: MW341206-MW3412013. Общая длина фрагментов генома представлена в табл. 1.

Таблица 1

Длина сегментов и размер полногеномной последовательности KITV

Название штамма	Длина, н.о.				
	Сегмент 1 (NS5)	Сегмент 2 (VP1)	Сегмент 3 (NS3)	Сегмент 4 (VP2 и VP3)	Размер генома, суммарно для -4х сегментов
KITV/2018/1	2963	2768	2714	2728	11173
KITV/2018/2	2963	2768	2670	2728	11129

Филогенетический анализ показал, что штаммы KITV/2018/1 и KITV/2018/2 формируют отдельную геногруппу вместе с ранее обнаруженным штаммом KITV/2017/1. Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей KITV/2018/1 и KITV/2018/2 со штаммом KITV/2017/1 составил 96–99 % (для разных сегментов), а по аминокислотным последовательностям 95–99 %. Наиболее близкородственными к KITV являются штаммы Mogiana tick virus (MGTV): MGTV/V4/11 и MGTV Yunnan2016. Уровень гомологии KITV с бразильским изолятом MGTV/V4/11 составил 91–95 %, а с китайским вариантом MGTV Yunnan2016 — 83–89 %.

Множественное выравнивание 5'–3' UTRs для KITV и MGTV показало наличие различных вставок, делеций и нуклеотидных замен в 5'–3' UTRs (табл. 2). Схема строения сегмента KITV и MGTV, а также предполагаемая структура UTRs представлена на рисунке. Вторичная структура 3' UTRs 1-го сегмента также является консервативной и представлена Y-структурой и SL для KITV и MGTV/V4/11. У MGTV Yunnan2016 данный регион представлен 2-мя Y-структурами. Вторичная структура 3' UTR 2-го сегмента штамма MGTV Yunnan2016 представлена 2-мя сложными Y-структурами Y-1, Y-2 (рисунок, б), а для KITV 3-мя Y-структурами Y-1, Y-2, Y-3 (рисунок, а, в). Структуры Y-1, Y-2 являются консервативными, а Y-3 вариабельной. Вариабельность Y-3 связана с появлением протяженной делеции в 35 нуклеотидов у KITV/2018/1 и KITV/2018/2, что приводит к изменению вторичной структуры этого района.

© А. А. Гладышева, А. В. Гладышева, В. А. Терновой, В. Б. Локтев, 2021

Для KITV вторичная структура 3’ UTRs 4-го сегмента представлена 2-мя Y-структурами, а для MGTV Yunnan2016 1-й Y-структурой. Значительное различие вторичных структур KITV и MGTV Yunnan2016 связано с существенными различиями размеров сегмента и уровнями их гомологии.

Таким образом, в ходе данной работы была определена полная нуклеотидная последовательность геномов KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Проведен филогенетический анализ генома KITV, выявлены мутации и делеции в 5’–3’ UTRs. Моделирование позволило предположить модели вторичных структур 5’–3’ UTRs и высказать гипотезу об их роли в репликации сегментированных флавивирусов в клетках хозяина. Дальнейшее исследование особенностей строения генома этих вирусов позволит понять особенности реализации генетической информация для новых многокомпонентных вирусов.

Таблица 2

Сравнительные размеры 5›–3’ UTRs для KITV и MGTV

Название штамма, место выделения	Длины 5›–3’ UTRs, н.о.							
	Сегмент 1		Сегмент 2		Сегмент 3		Сегмент 4	
	5’ UTRs	3’ UTRs	5’ UTRs	3’ UTRs	5’ UTRs	3’ UTRs	5’ UTRs	3’ UTRs
KITV/2018/1, Гвинея, Африка	91	130	154	355	110	180	109	250
KITV/2018/2, Гвинея, Африка	91	130	154	355	100	146	109	250
KITV/2017/1, Гвинея, Африка	104	122	157	390	97	146	109	247
MGTV/V4/11, Бразилия, Южная Африка	91	130	Нет данных	Нет данных	102	179	Нет данных	Нет данных
MGTV, Yunnan 2016, Китай, Азия	105	246	176	373	117	274	125	278

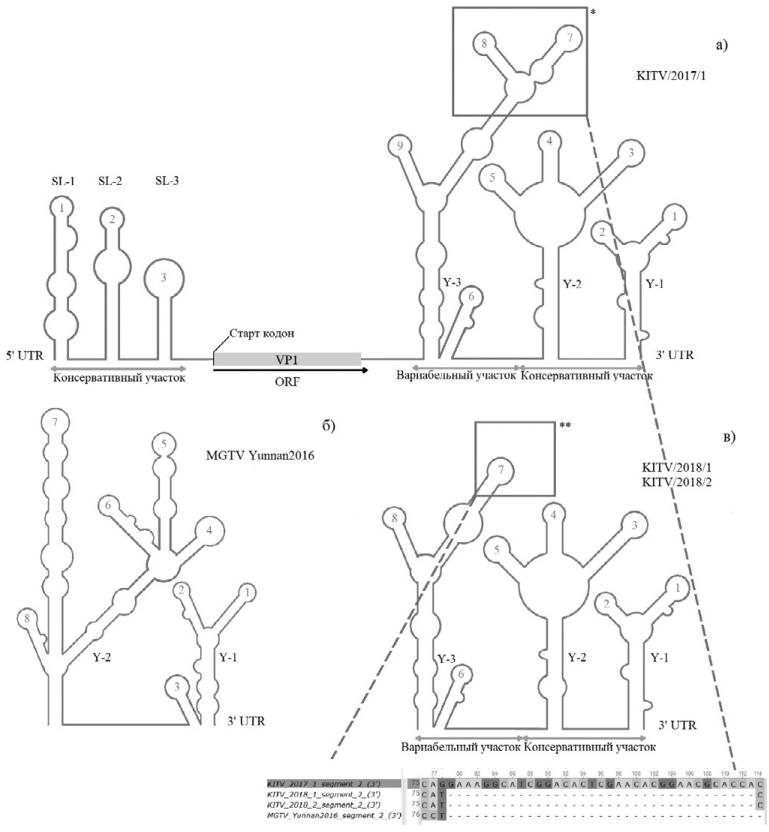


Схема строения сегмента 2 KITV/2017/1 и моделирование вторичной структуры 5’-3’ UTRs:
а — схема 2-го сегмента KITV/2017/1, где * — регион с видоизменяемой Y-структурой; *б* — вторичная структура 3’ UTR для MGTV Yunnan2016; *в* — 3’ UTR KITV/2018/1 и KITV/2018/2, где ** — регион с уникальной видоизмененной Y-структурой, связанной с наличием протяженной делеции

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИРКУЛЯЦИИ СЕЗОННЫХ КОРОНАВИРУСОВ И ИХ ПЕРЕСЕЧЕНИЯ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19 В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ*

И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, В. А. Помулев, О. П. Хрипко

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: diu1000@mail.ru

Аннотация

Коронавирусы человека относятся к семейству Coronaviridae и являются РНК-содержащими вирусами, COVID-19 — инфекционное заболевание, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2. Осложнения коронавирусной инфекции могут привести к поражению органов и систем, в том числе желудочно-кишечного тракта, дыхательной системы и т. д.

Цель работы

Выявление сезонных коронавирусов человека из биологического материала, направляемого для проведения исследования на выявление новой коронавирусной инфекции COVID-19.

С апреля 2020 г. в ФИЦ ФТМ проводятся исследования биологического материала (мазки из носоглотки и ротоглотки), поступающего от лечебных учреждений Новосибирской области на выявление новой коронавирусной инфекции COVID-19 методом ОТ-ПЦР.

Сезонные коронавирусы человека могут вызывать не только легкие ОРВИ и кишечные инфекции, но и могут быть причиной тяжелых вирусных пневмоний, как SARS-CoV-2 [1].

В настоящий момент известно, что пациенты, находящиеся на лечении в ковидных госпиталях с диагнозом «вирусная пневмония» не имеют позитивного результата на COVID-19, таким образом, мы предполагаем, что данная пневмония может быть вызвана другими коронавирусами человека [2].

Сформирована случайная выборка из 193 образцов поступившего материала от пациентов обратившихся за амбулаторной медицинской помощью с диагнозом ОРВИ и проведено исследование на наличие в нем следующих коронавирусов: SARS-CoV-2, OC-43, HKU1, NL-63 и ОРВИ-229 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Проведенные исследования показали следующие результаты приведенные в табл. 1.

Таблица 1

	SARS-CoV-2	OC43	HKU1	NL-63	ОРВИ229-
Количество позитивных образцов	8	17	0	8	14

При этом были выявлены образцы с положительным результатом на несколько коронавирусов, табл. 2.

Таблица 2

	NL-63 + ОРВИ229-	OC+43ОРВИ229-	SARS-CoV-2+ОРВИ-229
Количество позитивных образцов	1	1	1

На основании полученных результатов в настоящий момент ведется формирование выборки биологического материала от пациентов, находящихся на лечение в ковидных госпиталях Новосибирской области с диагнозом «вирусная пневмония», для проведения аналогичных исследований с целью подтвердить вышеуказанное предположение.

© И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, В. А. Помулев, О. П. Хрипко, 2021

* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Литература

1. Тимченко В. Н., Суховецкая В. Ф., Чернова Т. М. и др. Результаты 5-летнего мониторинга за циркуляцией сезонных коронавирусов у госпитализированных детей в препандемическом периоде // Детские инфекции. 2021. Т. 1. № 1(74) С. 5–11. doi:10.22627/2072-8107-2021-20-1-5-11.

2. *Gaunt E. R., Hardie A.* et al. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method // JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2010, p. 2940–2947. doi:10.1128/JCM.00636-10.

НОВЫЙ ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ШТАММ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА 6 СЕРОТИПА В ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д. С. Забелина[1], А. А. Гражданцева[3], Г. В. Кочнева[3], С. С. Куцейкин[1], И. Д. Осипов[1], М. В. Романенко[1,2], М. А. Сизова[1], С. В. Нетёсов[1]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Университет Миннесоты, Миннеаполис*
[3] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

E-mail: d.zabelina@g.nsu.ru

Аннотация

Для ранее сконструированного рекомбинантного вируса Ad6-hTERT-GMCSF была показана онколитическая активность на культурах клеток трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы U87MG. Была продемонстрирована эффективность экспрессии GMCSF зараженными рекомбинантным вирусом клетками линии A549. Также нами была показана терапевтическая эффективность Ad6-hTERT-GMCSF на моделях подкожных ксенографтов SCID-мышам в сравнении с Ad6 и Ad5 дикого типа.

Большинство аденовирусных онколитических препаратов конструируют на основе аденовируса 5 серотипа (Ad5), который является одним из наиболее изученных и используемых аденовирусов в генной терапии. Несмотря на свою доступность, Ad5 имеет ряд существенных недостатков, в связи с чем исследователи изучают альтернативные серотипы для применения в сфере онколитической терапии. Аденовирус серотипа 6 (Ad6) отличается высокой онколитической активностью, как было продемонстрировано нами и другими учеными на многих опухолевых моделях. Важно, что Ad6 значительно менее распространен в человеческой популяции в сравнении с Ad5, а также не обладает столь выраженным гепатотропизмом, что позволяет вирусу избегать инактивации макрофагами печени (клетками Купфера).

Ранее нами было показано, что дикий вирус Ad6 демонстрирует дозозависимый цитотоксический эффект на культуре клеток глиобластомы *in vitro*, а также значительно лучший терапевтический эффект при внутриопухолевой инъекции ксенографтов U87MG по сравнению с контрольным штаммом Ad5 дикого типа [1]. Для повышения терапевтической эффективности нами был сконструирован рекомбинантный штамм на основе Ad6, в котором район ранних генов E1 контролируется промотором гена теломеразы человека (hTERT), а с района аденовирусного гена E3 экспрессируется трансген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF). Для подтверждения биологической активности секретируемого GM-CSF, клетки линии A549 заражали рекомбинантным штаммом Ad6-hTERT-GMCSF, а затем оценивали пролиферативный ответ культуры чувствительных клеток TF-1 на добавление среды, полученной от зараженных клеток. Онколитическая активность Ad6-hTERT-GMCSF была показана на клеточных линиях MDA-MB-231 и U87MG *in vitro* и *in vivo*. Методом оценки жизнеспособности клеточных культур было показано, что встройка промотора hTERT и гена GMCSF в геном Ad6 не оказала отрицательного влияния на онколитическую активность рекомбинантного штамма по сравнению с таковой у природных штаммов. Нами была произведена оценка эффективности рекомбинантного штамма Ad6-hTERT-GMCSF *in vivo* на моделях подкожных ксенографтов MDA-MB-231 и U87MG в SCID мышах после трех инъекций — на 1, 3 и 5-й дни. Была подтверждена способность рекомбинантного штамма Ad6-hTERT-GMCSF значительно ингибировать рост опухоли на обеих моделях. Также было показано, что терапевтический эффект рекомбинантного штамма Ad6-hTERT-GMCSF сравним с таковым для Ad5 и Ad6 дикого типа, использованных в данном эксперименте в качестве контроля.

Таким образом, нами была исследована онколитическая активность ранее сконструированного рекомбинантного штамма Ad6-hTERT-GMCSF, однако его эффективность требует дальнейшего изучения, в том числе на иммунокомпетентной модели животных. Мы также не исключаем возможности дальнейшей модификации полученной генно-инженерной конструкции с целью улучшения противораковой эффективности.

Литература

1. Romanenko M. V. et al. Oncolytic Effect of Adenoviruses Serotypes 5 and 6 Against U87 Glioblastoma Cancer Stem Cells // Anticancer Res. 2019. Vol. 39. № 11. P. 6073–6086.

© Д. С. Забелина, А. А. Гражданцева, Г. В. Кочнева, С. С. Куцейкин, И. Д. Осипов, М. В. Романенко, М. А. Сизова, С. В. Нетёсов, 2021

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ *IN SITU*

Е. А. Здерева[1], М. К. Ибрагимова[1,2]

[1] *Томский государственный университет*
[2] *Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный медицинский центр РАН»*

E-mail: zdereva.e@gmail.com

Аннотация

Злокачественные опухоли репродуктивной системы являются наиболее частыми в структуре онкологической заболеваемости женщин, среди которых рак шейки матки (РШМ) остается одной из наиболее распространенных форм новообразований. Выявление РШМ в стадии *in situ* не входит в статистику заболеваемости РШМ и составляет приблизительно 17303 случая в год.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) *in situ* это нулевая стадия РШМ, при которой злокачественные изменения локализуются в эпителии шейки матки, не затрагивая базальную мембрану. Пусковым фактором возникновения РШМ более чем в 90 % случаев является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска. Результатом своевременного выявления и лечения РШМ *in situ* является предотвращение дальнейшего прогрессирования злокачественного процесса. Целью настоящего исследования было выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*.

Материалы и методы

В исследование включено 27 пациенток **в возрасте от 24 до 79 лет** с диагнозом РШМ *in situ*. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом PCR Real Time (RotorGene 6000, «Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10^5 клеток.

Результаты исследования

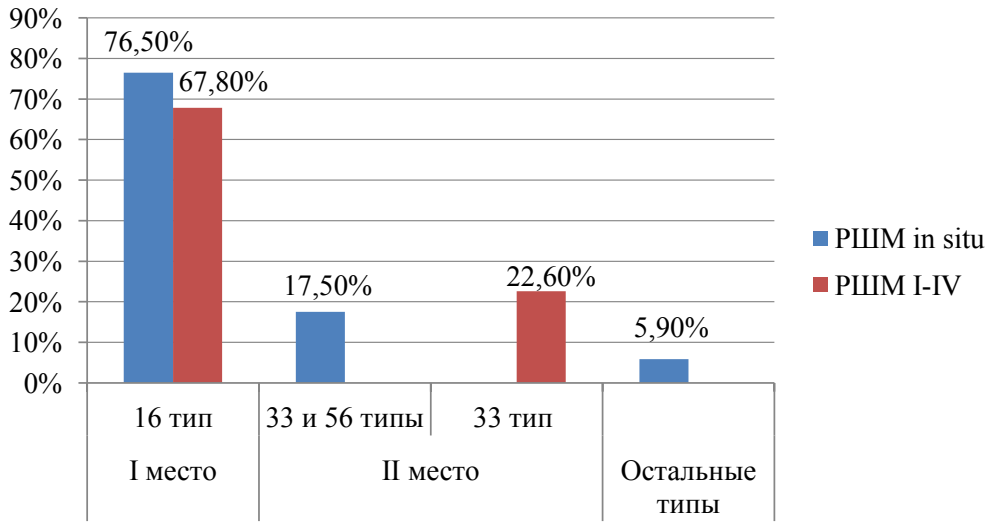
Наличие ВПЧ-позитивного РШМ *in situ*, ассоциированного с одним или одновременно с несколькими типами ВПЧ, было обнаружено у 17 пациенток (63,0 %) и у 10 больных (37,0 %) ВПЧ в опухоли не был выявлен. Стоит отметить, что в ранее проведенных исследованиях частота ВПЧ-позитивных пациенток с РШМ I–IV стадий составила 72,4 %, у 27,6 % пациенток ВПЧ в опухоли выявлен не был [1].

Генотипирование вирус-положительных образцов показало превалирование ВПЧ 16 типа (76,5 % случаев), что согласуется с литературными данными и полученными ранее результатами (67,8 %) [1]. На втором месте по частоте встречаемости находятся ВПЧ 33 и 56 типа (по 17,7 %). Согласно предыдущим исследованиям, в группе больных РШМ I–IV второе место занимал только ВПЧ 33 (22,6 %) [1]. Для пациенток с РШМ *in situ* в 5,9 % случаев детектировали ВПЧ 39, 45, 51, 52 типов (см. рисунок).

В результате исследования распространенности моно- и микст-инфицирования было выявлено преобладание моно-инфицирования (70,5 %), а частота встречаемости двух и более генотипов вируса одновременно составила 29,5 %.

При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки (<3lg ДНК ВПЧ/10^5 клеток) в исследуемой группе пациенток составило 29,4 %, при этом, показатель высокой, клинически значимой вирусной нагрузки (>3lg ДНК ВПЧ/10^5 клеток) составил 70,6 %. Согласно предыдущим результатам, в группе женщин с РШМ I–IV ранее был выявлен показатель малозначимой вирусной нагрузки равный 22,6 %, в то время как показатель клинически значимой вирусной нагрузки составил 77,4 % [1].

© Е. А. Здерева, М. К. Ибрагимова, 2021



Сравнение частоты встречаемости генотипов ВПЧ ВКР среди групп пациенток с РШМ *in situ* и РШМ I–IV

Выводы

Проведено выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*. Показан высокий уровень инфицированности ВПЧ ВКР в исследуемой выборке пациенток, наличие высокого уровня клинически значимой нагрузки и превалирование ВПЧ 16 генотипа.

Литература

1. Ибрагимова М. К. и др. Анализ выживаемости больных ВПЧ-ассоциированным и ВПЧ-негативным раком шейки матки // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9. С. 3–4.

МИНИГЕНОМНАЯ РЕПОРТЕРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО СЕГМЕНТА *S* ГЕНОМА ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ

Д. И. Ивкина, И. Р. Иматдинов

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

E-mail: daryaivkina1@gmail.com

Аннотация

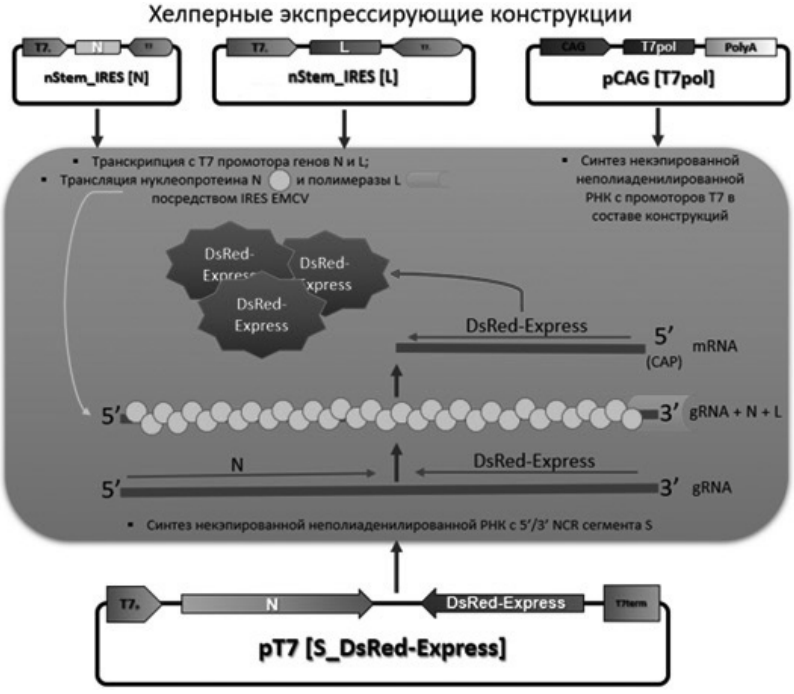
Получены генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию генов вирусных белков нуклеопротеина N и РНК-зависимой РНК-полимеразы L вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР), а также проведен синтез модифицированного S сегмента вируса ЛДР. Функциональная активность репортерной минигеномной системы подтверждена *in vitro* в экспериментах в перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13.

Лихорадка долины Рифт — зооантропонозное вирусное заболевание, характеризующееся некротическим гепатитом, прерыванием беременности, ретинитом и потерей зрения. К вирусу ЛДР восприимчивы крупный и мелкий рогатый скот, верблюды, приматы, а также люди. Основные пути заражения человека — контакт с инфицированными тканями животных и через укусы комаров родов *Aedes* и *Culex*. Вирус ЛДР принадлежит к вирусным патогенам, для работы с которыми требуется уровень биобезопасности BSL-3/4.

Согласно ВОЗ, ЛДР входит в список инфекционных заболеваний для которых требуется приоритетная разработка вакцинных и терапевтических препаратов (WHO, 2017). Использование методов обратной генетики позволяет проводить исследования в условиях BSL-2, что упрощает решение описанной задачи. Одно из перспективных направлений в данной области — минигеномные системы, основанные на экспрессии вирусных генов в клеточных линиях, позволяющие проводить функциональное изучение белков репликативной машинерии буньявирусов (N и L) и скрининг кандидатных лекарственных препаратов без использования инфекционного вирусного материала.

Цель данной работы — разработка репортерной минигеномной системы на основе модифицированного сегмента S вируса ЛДР для скрининговых исследований ингибиторов вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Получены следующие конструкции системы: хелперные плазмиды nStem_IRES-N и nStem_IRESL, обеспечивающие экспрессию генов белков N и L вируса ЛДР, имеющие последовательность внутреннего сайта посадки ри-



Репортерная минигеномная система
на основе модифицированного сегмента S вируса ЛДР

© Д. И. Ивкина, И. Р. Иматдинов, 2021

босомы вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES); рекомбинантный плазмидный вектор pT7_S_DsRedExpress, кодирующий кДНК копию S сегмента генома вируса ЛДР с заменой гена NSs на ген красного флуоресцентного белка DsRed-Express. Также к основным компонентам системы относится плазмида pCAG_T7pol (получена ранее в лаборатории), экспрессирующая под контролем промотора CAG ген ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7.

Транскрипция с рекомбинантных плазмид посредством ДНК-зависимой РНК-полимеразы Т7 приводит к продукции белков N и L, являющихся минимальными компонентами для репликации и транскрипции вируса. Вирусный нуклеопротеин покрывает синтезируемую РНК сегмента S, имеющую аутентичные 5'- и 3'-концы. Данный рибонуклеопротеиновый комплекс выступает матрицей для транскрипции и репликации РНК-зависимой РНК-полимеразой L. мРНК содержат 5'-кэп-структуры, полученные с помощью вирусного механизма захвата кэпа хозяйской РНК (см. рисунок).

Замена гена неструктурного белка NSs в S сегменте на ген DsRedExpress позволяет детектировать активность белков N и L методом флуоресцентной микроскопии, исключая фоновую экспрессию репортерного гена за счет антисмысловой ориентации открытой рамки считывания гена.

Проведена трансфекция клеток линии ВНК-21/13 полученными плазмидами для функционального изучения белков репликативного комплекса. На вторые сутки после трансфекции проанализирован уровень экспрессии гена DsRed Express по интенсивности флуоресценции. Оптимальное соотношение плазмид при трансфекции: nStem_IRES-L, pT7-S_DsRed-Express, nStem_IRES-N и pCAG_T7pol 1:3:6:6, соответственно.

Созданная репортерная система позволяет получить автономно реплицирующиеся минигеномы вируса ЛДР, что необходимо для первичного скрининга конкурентных нуклеозидных аналогов, перспективных в качестве противовирусных соединений.

IN VITRO СКРИНИНГ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ ЭНТЕРОВИРУСА А71

Е. В. Карпова[1,2], Е. С. Колпакова[1,2], В. Е. Ословский[3], Д. И. Осолодкин[1,2], Л. И. Козловская[1,2]

[1]Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России
[3]Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

E-mail: evg_karpova@mail.ru

Аннотация

Энтеровирус А71 (EV-A71) является одним из возбудителей везикулярного стоматита или синдрома «рука-нога-рот» (HFMD), в тяжелых случаях, приводящего к повреждению ЦНС или даже к смерти. Несмотря на большие усилия, одобренного противовирусного лечения данной инфекции не существует. Аналоги нуклеозидов широко используются для противовирусной терапии. В этом исследовании мы провели скрининг производных N^6-бензиладенозина против двух штаммов EV-A71 и выявили несколько соединений с эффективными концентрациями в микромолярном диапазоне против обоих штаммов. Таким образом, испытанные производные N^6-бензиладенозина могут стать основой для разработки новых препаратов для лечения энтеровирусных инфекций.

Энтеровирусные инфекции — это группа заболеваний, вызванных представителями рода *Enterovirus.* В настоящее время самая высокая заболеваемость и частота тяжелых случаев связаны с энтеровирусом А71 (EV-A71). Штамм EV-A71 является основным возбудителем везикулярного стоматита или синдрома «рука-нога-рот» (HFMD), который чаще всего заканчивается выздоровлением. Однако в некоторых случаях инфекция прогрессирует до тяжелой или смертельной болезни с неврологическими синдромами. Вспышки HFMD, затронувшие миллионы детей, регистрируют в Юго-Восточной Азии в последние 20 лет. Многие из них ассоциированы с появлением и распространением новых генотипов EV-A71, таких как C4. Приведенные факты определяют необходимость разработки низкомолекулярных профилактических и / или лекарственных средств против EV-A71 инфекции.

Целью данной работы являлась оценка противовирусной активности серии производных N^6-бензиладенозина против двух штаммов EV-A71: прототипного штамма BrCr (генотип A, GenBank ID U22521) и актуального штамма 46973 (генотип C4, GenBank ID KJ645808). Определение противовирусной активности проводили методом фенотипического скрининга по способности соединений ингибировать вирус-индуцированный цитопатический эффект (ЦПЭ) в культуре клеток RD.

Был проведен скрининг противовирусной активности 41 производного N^6-бензиладенозина, из них 23 производных ингибировали ЦПЭ, вызванного обоими штаммами, и еще 3 — только прототипным штаммом BrCr. Наиболее активными оказались монозамещенные производные N^6-бензиладенозина с метоксиметил-, метил-, трифторметильной группой или атомом галогена, а также дизамещенные производные, с EC_{50} менее 2 μM.

Данные соединения обладают высоким потенциалом для дальнейших исследований и создания новых противовирусных препаратов.

© Е. В. Карпова, Е. С. Колпакова, В. Е. Ословский, Д. И. Осолодкин, Л. И. Козловская, 2021

ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЭГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА ЛЯМБДА ПРИ АДЕНОВИРУСНОМ ПОРАЖЕНИИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

Н. А. Кихтенко[1], П. Г. Мадонов[1], А. Ж. Фурсова[1], Т. Н. Ильичёва[2], А. Г. Дурыманов[2]

[1] *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: dr.kikhtenko@gmail.com

Аннотация

Аденовирусное поражение глазной поверхности является одной из частых причин необратимого снижения зрительных функций. При этом на сегодняшний день нет эффективных противовирусных препаратов для лечения данной патологии. Перспективным препаратом является интерферон λ1, который относится к относительно недавно открытым интерферонам 3 типа, которые, обладая схожими свойствами с интерферонами 1 типа, имеют меньшее количество побочных эффектов из-за избирательного распределения их рецепторов в организме.

Цель исследования

Изучить противовирусную активность пэгилированного электронно-лучевым методом интерферона λ1 в отношении аденовируса человека на культуре клеток конъюнктивы человека.

Материалы и методы

Для исследования использовались клеточные линии нормальной конъюнктивы человека Chang conjunctiva clone 1–5c-4 и аденовирус человека серотипа 5.

Исследуемый препарат: человеческий интерферон λ1, пэгилированный электронно-лучевым методом, в концентрации 0,74 г/мл. Препарат сравнения: человеческий интерферон альфа 2b в концентрации 0,58 мг/мл. Использовались следующие разведения препаратов: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320, 1 : 640, 1 : 1280, 1 : 2560.

Лунки 96-луночного планшета засевали культурой клеток с посевной дозой 2×10^4 клеток на лунку. После формирования 80 % монослоя вносили препараты, используя по три лунки на каждое разведение. Клетки инкубировали 24 часа при 37 °С в атмосфере с 5 % содержанием CO_2. Затем культуральную среду удаляли и вносили вирус в дозах 1, 10 и 100 $ТЦИД_{50}$ на лунку в объеме 100 мкл.

Исследования проводили по трем схемам: № 1 — после адсорбции вирус не удаляли, клетки инкубировали в культуральной среде с исследуемым препаратом или препаратом сравнения; № 2 — после адсорбции вирус удаляли, клетки инкубировали в культуральной среде с исследуемым препаратом или препаратом сравнения; № 3 — после адсорбции вирус удаляли, клетки инкубировали в культуральной среде без препарата.

Противовирусную активность определяли по количеству жизнеспособных клеток посредством МТТ-теста. Эффективной дозой считали такую, при которой ингибирутеся вирусная репродукция на 50 % (ED_{50}).

Результаты и обсуждение

Антивирусная активность препарат в отношении HAdV при различных схемах эксперимента

Препарат	Эффективная противовирусная доза, ED_{50} мкг/мл								
	1 $ТЦИД_{50}$			10 $ТЦИД_{50}$			100 $ТЦИД_{50}$		
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 1	№ 2	№ 3	№ 1	№ 2	№ 3
ПЭГ-ИФН-λ1	37,0±2,4	4,5±0,5	4,8±0,8	>37	18,0±1,9	21,0±6,5	>37	>37	>37
ИФН-α2b	7,3±0,5	2,1±0,4	2,2±0,6	14,5±3,9	5,1±1,1	4,0±0,6	25±3,7	29±4,2	29±3,7

Результаты отражены в таблице. Из нее видно, что оба препарата обладали противовирусной активностью в отношении аденовируса при различных схемах введения, при дозе вируса 1 $ТЦИД_{50}$ и при увеличении ее в 10 раз. Причем при применении препарата в профилактических режимах (схемы № 2, 3), оба препарата показали схожую эффективность. При дозе вируса в 100 $ТЦИД_{50}$ противовирусной активностью обладал только

© Н. А. Кихтенко, П. Г. Мадонов, А. Ж. Фурсова, Т. Н. Ильичёва, А. Г. Дурыманов, 2021

интерферон α2b. Более низкая эффективность и преимущественно профилактическое действие являются ожидаемыми, поскольку из ранних исследований известно, что интерферон λ1 является «сторожевой» молекулой и предотвращает прохождение вируса через гистологические барьеры, одним из которых является конъюнктива. Однако это компенсируется меньшим количеством побочных эффектов, которые свойственны интерферону α2b.

Заключение

Проведенное исследование показало, что пэгилированный интерферон λ1 обладает противовирусной активностью в отношении аденовируса 5 серотипа. Это создает предпосылки для создания на его основе противовирусного препарата для профилактики и лечения вирусных заболеваний глазной поверхности.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ (SARS-COV-2 И ЧИКУНГУНЬЯ)

Е. С. Колпакова[1,2], Е. В. Карпова[1,2], А. С. Барашкова[3], Е. А. Рогожин[3], Л. И. Козловская[1,2]

[1] Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва
[2] Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России
[3] Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

E-mail: katerina.kolp@gmail.com

Аннотация

Новые вирусы периодически вызывают вспышки и эпидемии во всем мире, что в конечном итоге приводит к глобальным событиям, таким как нынешняя пандемия новой SARS-CoV-2 инфекции. Таким образом, очевидна острая необходимость в новых противовирусных препаратах. Показано, что растения являются источником большого разнообразия биологически активных веществ, среди которых могут быть новые противовирусные соединения. Мы провели фенотипический скрининг *in vitro* серии растительных экстрактов против новых оболочечных вирусов (SARS-CoV-2, CHIKV) и определили несколько активных для дальнейшей разработки.

Новые вирусы возникают постоянно и периодически вызывают вспышки и эпидемии во всем мире. Вспышки инфекций, вызванных такими вирусами, как SARS-CoV-2, и, в меньшей степени, вирусом Чикунгунья, приводят к серьезным глобальным проблемам в области здравоохранения и экономики, во многом из-за отсутствия специфического лечения. Это определяет постоянную потребность в разработке новых противовирусных препаратов. Растения способны производить соединения с разнообразной химической структурой. Многие из них служат для растений химическим оружием против микробных и других инфекций. Также обнаружено, что эти соединения могут обладать различной биологической активностью, полезной для здоровья человека, а также обладать высоким потенциалом для применения в качестве терапии при вирусных инфекциях.

В данной работе мы оценили противовирусную активность растительных экстрактов (водных, этанольных, бутанольных, гексановых, этилацетатных и белково-пептидных) в культуре клеток почки зеленой мартышки (Vero). Эксперименты проводили с использованием штамма ПИК35 SARS-CoV-2 (GISAID EPI_ISL_428852) и штамма Nic вируса Чикунгунья (GenBank ID MN271691-2). Противовирусную активность экстрактов оценивали по их способности подавлять вирус-индуцированное цитопатическое действие. В качестве препарата сравнения использовали N^4-hydroxycytidine.

Всего было исследовано 64 экстракта растительного происхождения, из которых 40 показали противовирусную активность против обоих вирусов. При этом, активность показали экстракты как различных растений (дуб (*Querqus robur* cortex), таволга вязолистная (*Filipendula ulmaria*), папоротник-орляк (*Pteridium aquilinum*) и др.), так и с различным экстрагентом, что указывает на потенциальное различие в химической структуре активных компонентов.

Экстракты, показавшие высокие значения ингибирующей активности, обладают высоким потенциалом для создания новых противовирусных препаратов и являются отправной точкой для наших дальнейших исследований.

© Е. С. Колпакова, Е. В. Карпова, А. С. Барашкова, Е. А. Рогожин, Л. И. Козловская, 2021

БЕЛКИ CD2V И ЛЕКТИН ОБУСЛАВЛИВАЮТ СЕРОЛОГИЧЕСКУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСА АЧС*

А. Ю. Кольцов, Г. С. Кольцова

Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский

E-mail: kolcov.andrew@gmail.com

Аннотация

Особое значение для разработки вакцины против АЧС имеет факт, что защитный иммунитет является серотип-специфичным. В данном исследовании с использованием химерных рекомбинантных штаммов вируса АЧС трех различных серотипов, в которых нативные гены EP153R и EP402R были удалены и заменены генами из гетерологичных вирулентных штаммов, было продемонстрировано, что белки CD2v и / или лектин С-типа вируса АЧС необходимы и достаточны для обеспечения серологической специфичности в РЗГА.

Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозная вирусная геморрагическая лихорадка домашних и диких свиней. Смертность восприимчивых животных может достигать 100 %. Вирус АЧС — крупный икосаэдрический цитоплазматический вирус и единственный представитель семейства *Asfarviridae*.

Несмотря на многолетние исследования, вакцины против АЧС до настоящего времени не зарегистрированы. Следует отметить, что защитный иммунитет против АЧС является серотип-специфичным, этот факт имеет особое значение для разработки вакцины. Восемь серогрупп (SG) вируса АЧС были идентифицированы на основе серологического типирования в реакции задержки гемадсорбции (РЗГА). Результаты серологического типирования в РЗГА коррелируют с результатами классических экспериментов по иммунизации животных с последующим заражением вирулентным штаммом, что указывает на важную роль предложенного метода типирования для анализа биологических свойств штаммов вируса АЧС.

Ранее мы продемонстрировали, что вирусные белки CD2v и лектин С-типа важны для защиты от гомологичной инфекции вируса АЧС. Хотя данные о роли этих белков в защите животных от АЧС противоречивы.

Целью данной работы является изучение роли белков CD2v и лектин в формировании серотипа вируса АЧС.

С целью подтверждения нашей гипотезы, что вирусные белки CD2v и лектин обуславливают сероспецифичность вируса АЧС, были сконструированы химерные рекомбинантные штаммы вируса АЧС трех различных серотипов. Родительские аттенуированные штаммы МК200 (SG3, Genotype V), КК262 (SG2, Genotype I), ФК32/135 (SG4, Genotype I) были использованы для создания химерных вирусов, в которых нативные гены EP153R и EP402R, кодирующие лектин и CD2v, были удалены и заменены генами из гетерологичного вирулентного штамма К49 (SG2, генотип I) или Ф32 (SG4, Genotype I). Рекомбинантные штаммы были получены путем гомологичной рекомбинации с «рекомбинационными кассетами».

Химерные вирусы имели нормальные характеристики репликации и гемадсорбции в первичной культуре клеток макрофагов свиней. Реакцию РЗГА проводили с использованием макрофагов свиней, родительских и химерных вирусов АЧС, а также гипериммунных контрольных сывороток, приготовленных против референтных штаммов каждого серотипа. Было продемонстрировано, что у всех химерных вирусов изменялась сероспецифичность, при этом определяемый серотип полностью соответствовал серотипу вирулентного штамма, из которого были амплифицированы гены EP153R и EP402R. Например, гемадсорбция рекомбинантного штамма DswMozaCon-vCD2v/Lectin, полученного на основе штамма МК200 (SG3, Genotype V) и содержащего гены штамма К49 (SG2, Genotype I), была ингибирована референтной сывороткой против серотипа 2, но не сывороткой против серотипа 3.

Эти данные указывают, что белки CD2v и / или лектин вируса АЧС необходимы и достаточны для обеспечения серологической специфичности в РЗГА. Генотипирование на основе последовательности генов EP153R и EP402R облегчит изучение разнообразия штаммов вируса АЧС, их антигенной изменчивости и предоставит информацию, имеющую решающее значение для дизайна, разработки и использования вакцины.

© А. Ю. Кольцов, Г. С. Кольцова, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУЛЕНТНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА АЧС С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА EP402R*

Г. С. Кольцова, С. А. Крутько, С. В. Белов, А. В. Коротин, М. М. Сухер, А. Ю. Кольцов

Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский

E-mail: burmakinags@gmail.com

Аннотация

Африканская чума свиней (АЧС) представляет собой угрозу для свиноводства во всем мире. В данном исследовании, используя вирулентный штамм вируса АЧС со специфической делецией гена EP402R в эксперименте по заражению свиней, мы продемонстрировали, что делеция данного гена не приводит к снижению вирулентности вируса. И хотя кинетика репликации рекомбинантного вируса в первичной культуре макрофагов свиней была идентична родительскому штамму, репликация *in vivo* делеционного варианта была несколько снижена на ранние сроки заражения.

Африканская чума свиней — контагиозная вирусная геморрагическая болезнь домашних и диких свиней с летальностью до 100 %, сопровождающаяся лихорадкой, цианозом кожи, диареей, судорогами. Вирус АЧС — крупный икосаэдрический цитоплазматический вирус семейства *Asfarviridae*. Распространение вируса АЧС в популяциях домашних свиней и диких кабанов приводит к существенным экономическим, социальным и экологическим последствиям.

Вакцины против АЧС не разработаны, а прогресс создания безопасных и эффективных вакцин сдерживается недостатком знаний о степени разнообразия штаммов вируса АЧС и вирусных антигенах, обеспечивающих защитный иммунитет у свиней. Ранее мы идентифицировали Т-клеточные эпитопы в структуре вирусных белков CD2v и лектин, что указывает на важную роль в Т-клеточном ответе при АЧС. Кроме того, нами было установлено, что CD2v важен для индукции защитного иммунитета против заражения гомологичным штаммом. Однако было отмечено, что репликация *in vivo* аттенуированного рекомбинантного варианта вируса АЧС с делецией гена EP402R была значительно снижена по сравнению с родительским штаммом, хотя рекомбинантный вирус эффективно реплицировался *in vitro*. В связи с тем, что имеющиеся данные о CD2v несколько противоречивы, необходимо продолжить исследования роли данного белка в развитии болезни.

С целью дальнейшего изучения роли белка CD2v в формировании фенотипа вируса АЧС и его репликации в организме хозяина в рамках данной работы было принято решение получить и охарактеризовать вирулентный рекомбинантный штамм вируса АЧС с делецией гена EP402R.

Родительский вирулентный штамм К49 вируса АЧС (SG2, Genotype I) был использованы для создания рекомбинантного варианта, в геноме которого ген EP402R, кодирующий белок CD2v был удален и заменен геном EGFP. Клетки A4C2 инфицировали родительским вирусом и трансфицировали «рекомбинационной кассетой». Рекомбинантный вирус селекционировали по репортерной флюоресценции EGFP методами предельных разведений в первичной культуре клеток макрофагов свиней.

Рекомбинантный вирус эффективно реплицировался в первичной культуре клеток макрофагов свиней и ККМС без гемадсорбции. Было продемонстрировано, что кинетика репликации *in vitro* делеционного мутанта была идентична родительскому штамму К49.

Наиболее важным вопросом, на который необходимо было ответить в рамках данного исследования, был вопрос о роли белка CD2v в вирулентности вируса, его репликации и распространении в организме хозяина. С этой целью был проведен эксперимент по заражению двух групп животных (n = 5) родительским (К49) и рекомбинантным штаммом в дозе 1000 TCID50. Было продемонстрировано, что делеция гена EP402R не приводит к снижению вирулентности вируса. Однако титры вируса в крови животных, инфицированных рекомбинантным штаммом, на 3-и сутки после заражения (д.п.з.) были ниже, чем у животных, инфицированных штаммом К49. Существенной разницы на 5 и 7 д.п.з. не было обнаружено. Сроки гибели и клинические признаки у всех животных были сопоставимы.

Эти данные указывают, что белок CD2v может иметь значение для *in vivo* репликации или виремии как вирулентных, так и аттенуированных вариантов вируса АЧС.

© Г. С. Кольцова, С. А. Крутько, С. В. Белов, А. В. Коротин, М. М. Сухер, А. Ю. Кольцов, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА КАРЛИКОВОЙ МОЗАИКИ КУКУРУЗЫ (MAIZE DWARF MOSAIC VIRUS) МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

А. А. Лопаткин, Ю. А. Шнейдер, Т. С. Живаева, Н. А. Хорина

Всероссийский центр карантина растений, р. п. Быково

E-mail: lopatkin86@mail.ru

Аннотация

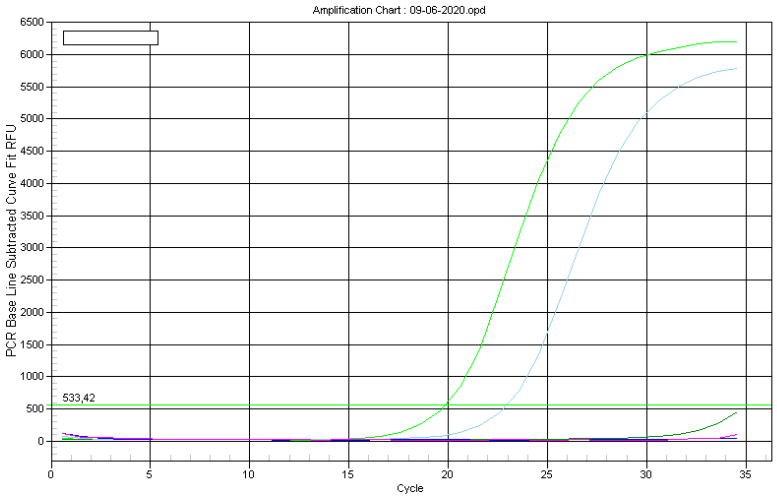
Кукуруза (*Zea mays L.*) — одна из самых распространенных зерновых культур в мире. Она занимает третье место по занимаемым посевным площадям в мире. Посевные площади кукурузы на зерно в России в 2018 г., по данным Росстата, составили 2 452,2 тыс. га. В 2018 г. собрано 11 162,6 тыс. т кукурузы. Зерновые культуры — высоколиквидный товар на внешнем рынке. При этом возрастающие фитосанитарные требования стран-импортеров ужесточают требования к контролю качества зерна. В связи с этим необходима разработка методов диагностики фитопатогенов, заражающих зерновые культуры и входящие в перечень карантинных организмов стран-импортеров зерна.

Цель работы — разработка диагностики вируса карликовой мозаики кукурузы (*Maize dwarf mosaic virus*) в образцах зерновой продукции. Для обнаружения вируса был выбран метод ПЦР «в реальном времени» с TaqMan зондом, как наиболее быстрый и просто воспроизводимый в условиях лабораторной диагностики. Для подбора праймеров использовали последовательности полных геномов вируса, аннотированные в базе данных NCBI (всего 31 последовательность). В ходе анализа геномов в качестве маркерных последовательностей были выбраны три консервативных участка внутри последовательности гена, кодирующего белок оболочки. К выбранным участкам были подобраны праймеры (CPF и CPR) и зонд (CP2R).

Апробация праймерной системы проводилась на изоляте MDMV PC-0802, а также на изоляте наиболее близкородственного вируса — вируса карликовой мозаики сахарного тростника (*Sugarcane mosaic virus*) SCMV PC-0731 и двух вирусов, способных заражать кукурузу — потивируса мозаики сорго (*Sorghum mosaic virus*) SrMV PV-0801 DSMZ и махломовируса хлоротической крапчатости кукурузы (*Maize chlorotic mottle virus*) MCMV PC-1087. Все изоляты производства фирмы DSMZ (Германия). Выделение РНК проводили с помощью набора «ПробаНК» (Агродиагностика, Россия). Для проведения обратной транскрипции и амплификации полученной, использовали набор OneTube RT-PCR TaqMan (Евроген, Россия). В ходе исследований была показана специфичность подобранных праймеров — положительный результат показал только целевой вирус, а в случае ПЦР на матрице кДНК других вирусов продукт амплификации не детектировался.

Следующим этапом работы стала проверка семян кукурузы на наличие вируса карликовой мозаики. Для этого были отобраны образцы из Республики Кабардино-Балкарии, Краснодарского и Приморского края, Ростовской и Московской областей. По результатам диагностики показано наличие вируса карликовой мозаики кукурузы в образце из Кабардино-Балкарии. Но для изолята, значение порогового цикла составило 20, а для РНК, выделенного из зерна — 23 (см. рисунок).

Таким образом, подобранные в ходе работы праймеры и зонд продемонстрировали специфичность и возможность применения для диагностики вируса карликовой мозаики кукурузы в семенном материале и зерновой продукции. Данная тест-система может быть рекомендована для оценки экспортируемой продукции.



Результаты диагностики зерна на наличие вируса карликовой мозаики кукурузы. Салатовым, голубым, зеленым, розовым и синим цветами обозначены положительный контроль MDMV PC-0802, образец из Кабардино-Балкарии, Краснодарского края, Ростовской области и отрицательный контроль соответственно

©А. А. Лопаткин, Ю. А. Шнейдер, Т. С. Живаева, Н. А. Хорина, 2021

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ АНТИТЕЛА НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *IN VIVO*, НО НЕ *IN VITRO*

А. Л. Матвеев[1], И. В. Козлова[2], Л. А. Емельянова[1], Я. А. Хлусевич[1], И. К. Байков[1], Н. В. Тикунова[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск*

E-mail: guterus@gmail.com

Аннотация

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является наиболее важным патогеном, переносимым клещами в семействе *Flaviviridae* и вызывает одну из самых тяжелых нейроинфекций человека. В данной работе были исследованы иммунохимические и биологические свойства антитела FVN-102, которое не обладало вируснейтрализующими свойствами *in vitro*, что было показано ранее.

С использованием фагового дисплея и укороченных вариантов белка Е вируса клещевого энцефалита был локализован эпитоп мкАТ FVN-102, он является прерывистым и находится во 2-м домене гликопротеина Е ВКЭ, в областях между 142 по 147 и 206 по 212 аминокислотным остаткам. Узнаваемый антителом участок белка с 142 по 147 аминокислотный остаток находится внутри третичной структуры белка и может играть роль во взаимодействии антитела FVN-102 и белка Е, только уже после формирования комплекса антитело-белок Е, распознаваемый антителом участок расположенный, с 206 по 212 аминокислотный остаток, перекрывается с эпитопом, распознаваемым антителом А5, которое способно вызывать антитело-зависимое усиление инфекции *in vitro*, причем не опосредованное взаимодействием константных доменов антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток, поэтому для изучения молекулярных механизмов возникновения антитело-опосредованного усиления инфекции нами была изучена способность этого антитела усиливать инфекцию *in vivo*. Для этого мышей BALB/c инфицировали ВКЭ в низкой дозе около 10 LD_{50}. После заражения мышам вводили мкАТ FVN-102 в двух дозах высокой — 100 мкг и низкой — 10 мкг на мышь. В экспериментах мкАТ FVN-102 продемонстрировало 25 % защитную эффективность при введении в высокой дозе и никакой защиты не наблюдалось у мышей, получавших низкую дозу мкАТ FVN-102, для этой группы была изучена способность антитела FVN-102 опосредовать усиление ВКЭ-инфекции у мышей, и результаты показали, что мкАТ FVN-102 не усиливает инфекцию *in vivo*. Кроме того, было исследовано влияния одновременного введения мкАТ FVN-102 и высоко протективного антитела chFVN145 на развитие ВКЭ-инфекции *in vivo*, для этого мышей BALB/c инфицировали ВКЭ в низкой дозе около 5 LD_{50}. После заражения мышам вводили смесь двух антител мкАТ FVN-102 и chFVN145 в трех дозах 50+50, 10+10 и 5+5 мкг на животное и одно мкАТ chFVN145 в двух дозах 50 и 10 мкг на животное. Результаты показали, что при совместном введении двух антител мкАТ FVN-102 и chFVN145 не наблюдалось уменьшения протективной эффективности антитела chFVN145. Таким образом, было продемонстрировано, что антитело не обладающее вируснейтрализующими свойствами *in vitro*, может обладать протективными свойствами *in vivo*. Кроме того было показано, что несмотря на то, что это антитело потенциально может обладать ADE-эффектом *in vitro*, оно никак не усиливает ВКЭ-инфекцию на модельных животных и не влияет на противовирусные свойства высоко протективного антитела chFVN145.

© А. Л. Матвеев, И. В. Козлова, Л. А. Емельянова, Я. А. Хлусевич, И. К. Байков, Н. В. Тикунова, 2021

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО АЛГОРИТМА СОЗДАНИЯ МУЛЬТИПРАЙМЕРНЫХ ПАНЕЛЕЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ШИРОКОГО СПЕКТРА ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ*

А. Д. Мацвай[1,2], А. А. Айгинин[1], И. М. Михайлов[1], А. В. Сай[1], К. Ф. Хафизов[2], Г. А. Шипулин[1]

[1] *ФГБУ «ЦСП» ФМБА РФ, Москва*
[2] *ФГАОУ ВО «МФТИ (НИУ)», Москва*

E-mail: AMatsvay@cspmz.ru

Аннотация

Нами разработан универсальный алгоритм для дизайна праймерных панелей при проведении амплификации и последующего анализа методами высокопроизводительного секвенирования любых таксономических групп вирусных патогенов. Эффективность методики была показана на группе вирусов, вызывающих респираторные заболевания.

Большинство диагностических наборов для определения этиологии вирусных заболеваний основаны на методах ПЦР и позволяют выявлять ограниченный круг патогенных микроорганизмов. Разработка методов широкого скрининга, основанных на применении технологий высокопроизводительного секвенирования, позволит своевременно и эффективно применять необходимые терапевтические меры. Для успешного использования таких методик в клинической практике актуальной является задача увеличения чувствительности и снижения себестоимости исследования.

Для решения этой задачи был разработан алгоритм дизайна мультипраймерных панелей для целевой амплификации нуклеиновых кислот вирусных патогенов. Алгоритм основан на *k*-мерном подходе, при использовании которого не применяются построения множественных выравниваний вирусных геномов, что позволяет осуществлять подбор праймерных последовательностей на гетерогенные группы вирусных патогенов. Был применен матричный способ хранения и анализа данных о выравниваниях коротких последовательностей, для осуществления высокоэффективных параллельных тензорных вычислений на графических процессорах, что позволило обрабатывать большое количество геномных последовательностей одновременно. Алгоритм позволяет осуществлять введение вырожденных позиций, проводить оценку консервативности, самокомплементарности и термодинамических характеристик праймерных структур, учет стабильности отжига их 3' концевых областей, задание желаемой длины целевого ампликона, оценку вероятности формирования гомо- и гетеродимерных структур.

С использованием разработанного алгоритма была создана праймерная панель, состоящая из 78 вырожденных структур, позволяющая проводить одновременное исследование патогенных для человека представителей следующих таксономических групп: рода *Mastadenovirus* семейства *Adenoviridae*; родов *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae*; семейств *Orthomyxoviridae* и *Paramyxoviridae*; рода *Bocaparvovirus* семейства *Parvoviridae*; семейств *Picornaviridae*, *Pneumoviridae*, рода *Betapolyomavirus*, семейства *Polyomaviridae*. Согласно *in silico* моделированию, разработанная панель обеспечивает покрытие 99,81 % известных представителей указанных групп.

Для *in vitro* тестирования в качестве контрольного материала были использованы лиофилизированные вирусные культуры и клинические образцы. Была показана эффективность разработанного метода для выявления аденовирусов человека (типов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 21); бокавируса; альфакоронавирусов (229E), бетакоронавирусов (SARS-CoV-2); вируса гриппа (тип B); вируса кори; метапневмовируса; ортопневмовируса; вируса пара-гриппа (1, 2, 3 тип); риновирусов (тип 13, 15, 17, 26, 29). При этом была получена 100 % сходимость с результатами, полученными на ПЦР-тест системах.

Таким образом нами был разработан алгоритм дизайна таргетных панелей для проведения широкого скрининга вирусных патогенов, показана его эффективность в выявлении вирусов, вызывающих респираторные заболевания.

© А. Д. Мацвай, А. А. Айгинин, И. М. Михайлов, А. В. Сай, К. Ф. Хафизов, Г. А. Шипулин, 2021

* Работа выполнена в рамках проекта государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (номер государственного учёта в ЕГИСУ НИОКТР АААА-А20-120111090095-5).

ВКЛАД РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОВАРИАНТОВ SARS-COV-2 В ПОДЪЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 ЗИМОЙ 2020–2021 В РФ

М. И. Надтока, С. Ю. Селезов, В. Г. Акимкин, А. С. Сперанская, А. С. Черкашина, В. В. Каптелова, А. Е. Самойлов, С. С. Саенко, С. О. Синицын, Е. В. Корнеенко, К. Ф. Хафизов, И. А. Котов, А. В. Дудорова, А. Г. Голубева, М. И. Зотова, Ю. Ю. Берлина, Е. Д. Соловьёва, А. В. Валдохина, В. П. Буланенко, О. Ю. Шипулина, Л. Ю. Кондрашева, Д. В. Дубоделов

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

E-mail: maximnadtoka@gmail.com, 1selezov1@gmail.com

Аннотация

На сегодняшний день достоверно известно, что причиной третьего подъема количества заболевших новой коронавирусной инфекцией в мире стало активное распространение геновариант Дельта (классификация по PANGOlin — B.1.617.2). Однако ответ на вопрос, какие именно геновариант могли стать причиной развития второго подъема заболеваемости в разных странах, не столь очевиден.

Введение

Второй подъем заболеваемости COVID-19 пришелся на период с начала декабря 2020 г. по конец января 2021 г. Исходя из данных портала GISAID, существенный вклад в рост заболеваемости в странах ЕС внес геновариант SARS-CoV-2 Альфа (классификация по PANGOlin — B.1.1.7), который впервые был обнаружен в Великобритании в сентябре 2020 г. и к середине декабря завезен во все крупные страны мира. Однако, ситуация во время второго подъема заболеваемости новой коронавирусной инфекцией в Российской Федерации значительно отличалась от ситуации в остальном мире. Рост числа заболевших поначалу был менее выраженным, с практически нулевой долей представленности геновариант Альфа. В результате возник вопрос об идентификации иных геновариантов, помимо Альфа, доминировавших в популяции вирусов в то же самое время.

Результаты

Организованный сбор биологического материала на территории РФ вкупе с разработанной специфичной праймерной панелью для полногеномной амплификации вируса SARS-CoV-2 позволили получить данные, охватывающие период с октября 2020 г. по апрель 2021 г. Работы по секвенированию проводили на базе ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Для анализа использовали образцы, полученные из Москвы, Московской области, ряда регионов ЦФО, СЗФО и ДВФО. Применение технологий высокопроизводительного секвенирования, а также секвенирования по Сэнгеру, позволило получить большие массивы геномных прочтений.

Проведенный анализ позволил установить, что доминирующий в период с декабря 2020 г. по январь 2021 г. в странах Европы геновариант B.1.1.7 не получил схожей картины распространения в РФ. Анализ накопленных данных позволил оценить динамику представленности различных геновариантов SARS-CoV-2 и проследить появление новых линий. Сравнение полученных результатов для РФ с информацией по другим странам показало наличие вариантов, предположительно, более специфичных для нашей страны, прежде всего, B.1.1.397 и B.1.1.317. Также, к моменту спада заболеваемости, заметную долю в популяции стал занимать геновариант B.1.1.523. Данные варианты встречались на территориях других стран реже и в значительно более низком процентном соотношении по сравнению с другими линиями SARS-CoV-2. Следует отметить, что ранее Klink с соавторами [1] оценивали представленность B.1.1.397 и B.1.1.317 в России в 58 % (в совокупности) в период с февраля по март 2021 г. По нашим данным, совокупная доля этих геновариантов составляла 60 % в период второго подъема заболеваемости, а к концу марта 2021 г. упала примерно до 40 %.

Заключение

По международным данным портала GISAID.org в период с декабря по январь 2021 г. доминирующим геновариантом в Европе был *B.1.1.7 — Alpha.* Однако, для России ситуация отличалась: на протяжении рассматриваемого периода времени доля варианта *B.1.1.7* не превышала 40 %. Падение представленности линии *B.1.1.7* совпадает во времени с возрастанием доли варианта *B.1.1.523*, получившего заметное распространение только в пределах РФ.

Литература

1. Klink G. et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia // medRxiv. — 2021.

© М. И. Надтока, С. Ю. Селезов, В. Г. Акимкин, А. С. Сперанская, А. С. Черкашина, В. В. Каптелова, А. Е. Самойлов, С. С. Саенко, С. О. Синицын, Е. В. Корнеенко, К. Ф. Хафизов, И. А. Котов, А. В. Дудорова, А. Г. Голубева, М. И. Зотова, Ю. Ю. Берлина, Е. Д. Соловьёва, А. В. Валдохина, В. П. Буланенко, О. Ю. Шипулина, Л. Ю. Кондрашева, Д. В. Дубоделов, 2021

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИТЕЛЕЙ АЛТАЙСКОГО КРАЯ, С ВЫЯВЛЕННОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТЬЮ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Т. М. Налимова[1], В. А. Екушов[1], В. В. Шевченко[2], Е. А. Ильина[2], А. В. Тотменин[1], Н. М. Гашникова[1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Алтайский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями, Барнаул*

E-mail: nalimova_tm@vector.nsc.ru

Аннотация

Показатель заболеваемости ВИЧ по Алтайскому краю в 1,5 раза выше, чем в среднем по РФ. В последнее время в Алтайском крае намечается тенденция к снижению заболеваемости, на 01.01.2021 г. этот показатель был ниже уровня 2019 г. на 22,9 %. Такая ситуация стала возможной благодаря увеличению охвата ВИЧ-инфицированных лиц антиретровирусной терапией (АРВТ). На начало 2021 г лечение получали 80 % от числа пациентов, стоящих на учете (13804 человека).

Цель исследования — анализ развития резистентности ВИЧ в ответ на проводимую антиретровирусную терапию среди ВИЧ-инфицированных жителей Алтайского края.

За период с января по июнь 2021 г. было исследовано 109 образцов ВИЧ-1, собранных от жителей Алтайского края. На момент забора крови у всех пациентов регистрировалась неэффективность АРВТ. Возраст пациентов варьировал от 3 до 63 лет, большая часть из них относилась к возрастной группе 31–45 лет (50,9 %). Медиана вирусной нагрузки на момент забора крови составила $2{,}85 \cdot 10^5$ (от 50 до $1{,}60 \cdot 10^7$).

Для всех образцов ВИЧ-1, с помощью секвенирования по Сэнгеру, были расшифрованы области гена pol размером 1300 п.н. С использованием Стэндфордской базы данных (https://hivdb.stanford.edu) для последовательностей ВИЧ-1 проведен анализ наличия мутаций резистентности вируса.

Филогенетический анализ изученных ВИЧ-1 выявил следующее распределение геновариантов среди исследованных образцов: CRF63_02A был найден в 50,4 %, субтип A6 в 47,7 % и по одному случаю пришлось на CRF 02_AG ВИЧ-1 и URF A_63_02A ВИЧ-1.

Для 77 (70,6 %) пациентов были выявлены ВИЧ-1, несущие мутации, связанные с развитием резистентности вируса. Мультирезистентность ВИЧ-1 встречалась у 6 (5,5 %) пациентов. В 44 (40,3 %) случаях ВИЧ-1 содержал мутации, обуславливающие резистентность к ННИОТ и НИОТ, в 18 (16,5 %) — только к НИОТ, у 5 (4,6 %) пациентов — к ННИОТ, в 2-х (1,8 %) случаях найдена резистентность к ИП и НИОТ, по 1 (0,9 %) случаю — к ННИОТ и ИП.

На терапии с применением ИП находилось 34 пациента, принимающих лечение от 9 месяцев до 4,8 лет (в среднем 2,5 года). Распределение мутаций, вызывающих резистентность высокого уровня к ИП, было следующее: V82A (4 %), L33F, M46l по 3 %, N88S, I54V по 2 %, M46L и I50L — в 1,8 % случаев. Мутации, снижающие восприимчивость к ИП — Q58E (3 %) и G73D и F53L найдены в 1,8 % случаев.

Полиморфная мутация K20R встречалась чаще в выборке субтипа A6 (в 26,9 %), чем среди CRF63_02A (9,2 %), тогда как замена L10V обнаруживалась среди CRF63_02A в 22,2 %, у ВИЧ-1 A6 — в 7,6 %, а мутация L10I, наоборот, в выборке A6 ВИЧ-1 в 25 %, нежели среди CRF63_02A (3,7 %).

Среди мутаций, вызывающих резистентность высокого уровня к НИОТ, были описаны M184V (46 %), K65R (13,9 %), M184I (4 %), L74I и Y115F по 3 %, L74V (2 %), L210W (1,9 %). Замена T215F выявлялась чаще у A6 ВИЧ-1 (11,5 %), чем у CRF63_02A (1,8 %).

Сорок три пациента на момент забора крови находились на схемах, содержащих ННИОТ, в среднем 2,6 года (от полугода до 7 лет). В изученной выборке были описаны специфические для геновариантов ВИЧ мутации высокой резистентности вируса к ННИОТ: только у ВИЧ субтипа A6 — G190S\A (15,3 %); только у CRF63_02A — Y188L (11,1 %), L100I и E138K (по 3,7 %), M230I (1,8 %), комбинация L234I+V106A в 1,8 %. Также были найдены основные мутации резистентности ВИЧ K103N (25 %), Y181C (A — 19,2 %, CRF63_02A — 3,7 %), M230L (3 %).

Результаты анализа резистентности ВИЧ-1 были использованы для коррекции схем АРВТ, в некоторых случаях — для доказательства низкой приверженности пациентов к терапии. С увеличением количества лиц, получающих АРВТ, введение своевременного контроля за развитием резистентности ВИЧ-1 в случаях неэффективного лечения является крайне актуальным.

© Т. М. Налимова, В. А. Екушов, В. В. Шевченко, Е. А. Ильина, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова, 2021

ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ COVID-19 С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ БОЛЕЗНИ И ДИАГНОСТИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ*

А. О. Никитин[1], О. Н. Шапрова[2], Е. А. Колосова[2,3], Д. В. Шаньшин[2], С. А. Ельчанинова[4], Д. Н. Щербаков[2,3]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3]*Алтайский государственный университет, Барнаул*
[4]*Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул*

E-mail: a.nikitin1@g.nsu.ru

Аннотация

Были проведены измерения титра антител сывороток крови больных COVID-19, перенесших заболевания в тяжелой форме. В качестве антигенов были выбраны белки RBD и белок N, нуклеопротеин. Антитела IgG к этим белкам были обнаружены во всех исследованных сыворотках переболевших. Были показаны достоверные отличия в уровне антител против белка RBD у мужчин и женщин.

Одной из важнейших мер противодействия инфекционным заболеваниям является система диагностики. Несмотря на разработку и внедрение методов детекции специфических антител продолжается поиск лабораторных маркеров иммунитета к SARS-CoV-2. Дифференциальное использование антигенов SARS-CoV-2 необходимо для определения формирования протективного иммунитета у лиц вакцинированных и перенесших COVID-19. Основными мишенями гуморального иммунного ответа являются белки S и N.

Функциональный домен RBD поверхностного белка — ключевой фрагмент S белка, участвующий в проникновении вируса в клетку. Титр антител IgG к этому домену может быть одним из маркеров протективного иммунного ответа к COVID-19.

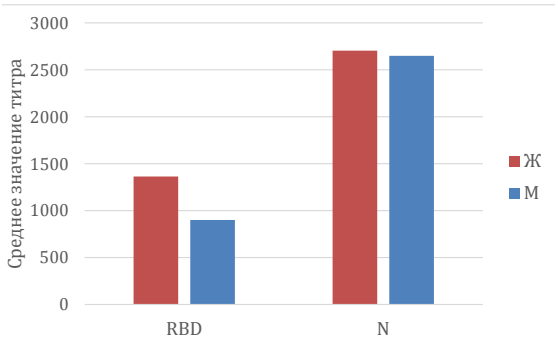


Диаграмма среднего значения титров по RBD и CoVN для мужского и женского пола

CoVN — нуклеокапсидный белок, способный противодействовать иммунному ответу хозяина, как вирусный супрессорный белок RNAi. Вырабатываемые антитела к данному белку служат маркером наличия заболевания.

В работе было изучено 110 образцов сывороток крови госпитализированных больных с диагностированной пневмонией. Сыворотки предоставлены зав. кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностикой, д-р биол. наук, проф. С. А. Ельчаниновой.

Был проведен твердофазный иммуноферментный анализ. В качестве антигенов использовали химерные белки: RBD, соответствующий рецептор-связывающему домену, и CoVN, соответствующий полноразмерному белку N вируса SARS-COV-2. В качестве конъюгата использовали козьи поликлональные антитела Anti-Human IgG, меченные пероксидазой хрена.

Сыворотки больных COVID-19 титровали от 1/100 до 1/3200 с шагом два. Контрольные сыворотки наносили в двух повторах, значение оптической плотности высчитывали как общее среднее. Как положительный контроль использовали сыворотку 2020 г. переболевшего COVID-19 с диагнозом, подтвержденным ПЦР, как отрицательный — сыворотку, полученную в 2017 г.

Среднее значение титров по RBD-домену для женщин и мужчин составило 1/1363 и 1/900, а значения для N-гликопротеина 1/2704 и 1/2650, соответственно (см. рисунок).

Полученные результаты свидетельствуют о корректности использования белков RBD и N в качестве специфических маркеров COVID-19. Титр антител против белка N у мужчин и женщин не отличается. В тоже время уровень антител против RBD у женщин статистически выше (среднее значение титра антител против RBD-домена у мужчин оказалось в 1,5 раз ниже, чем у женщин).

© А. О. Никитин, О. Н. Шапрова, Е. А. Колосова, Д. В. Шаньшин, С. А. Ельчанинова, Д. Н. Щербаков, 2021

* Работа выполнена при поддержке государственного задания (№ FZMW-2020-0007) и стипендии президента РФ (СП-5107.2021.4).

СРАВНЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ НА COVID-19 В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ*

Е. О. Овчинникова, О. П. Хрипко, Ю. И. Хрипко, И. Ю. Деулин

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: miss.ov4innikova@mail.ru

Аннотация

Аннотация: в статье сравниваются диагностические тест-системы на примере положительных результатов ПЦР исследований на COVID-19. В ходе исследования сделали вывод, что процент положительных результатов в выборке образцов обуславливается не тест-системой, а волновым характером течения коронавирусной инфекции.

Введение

В связи с распространением новой коронавирусной инфекцией перед специалистами разного профиля стоит вопрос о идентификации вируса в короткие сроки с целью установления точного диагноза. Основным методом верификации вирусной инфекции является метод полимеразной цепной реакции. На данный момент для этого метода исследования доступны тест-системы разных производителей.

Цель исследования: сравнить количество положительных результатов на разных тест-системах ПЦР у пациентов с подозрением на COVID-19 в Новосибирской области.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ результатов ПЦР исследований на коронавирусную инфекцию, выполненных в клинико-диагностическом центре ФИЦ ФТМ. В анализ включены 5760 образцов биологического материала (из носа и зева) полученные от лечебных учреждений Новосибирской области в период с февраля по июнь 2021 г. Использованы официальные данные о заболеваемости коронавирусной инфекцией в Новосибирской области, представленные на сайте СТОПКОРОНАВИРУС.РФ.

Результаты

Использовали диагностическую тест-систему РеалБест SARS-CoV-2 (РЗН 2020/9896 РУ) АО «Вектор-Бест», на которой было выполнено 1920 образцов (20 планшетов по 96 проб) за период с февраля по март 2021 г., из них получено 344 положительных образца, что составляет 17,9 % от общего числа выполненных тестов (рис. 1).

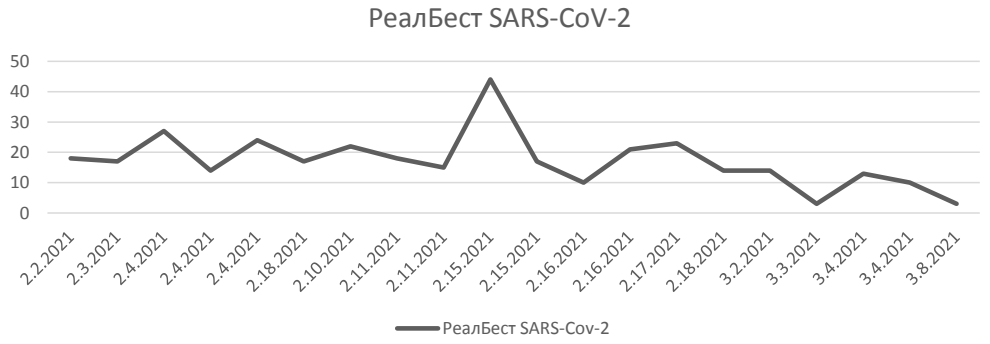


Рис. 1. Динамика положительных результатов на системе РеалБест SARS-CoV-2

На системе АмплиСенс Cov-Bat-FL (РЗН 2014/1987 РУ) ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в апреле 2021 г., выполнено 1920 образцов. Из них положительных проб 135 (7,0 %) (рис. 2).

© Е. О. Овчинникова, О. П. Хрипко, Ю. И. Хрипко, И. Ю. Деулин, 2021

* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

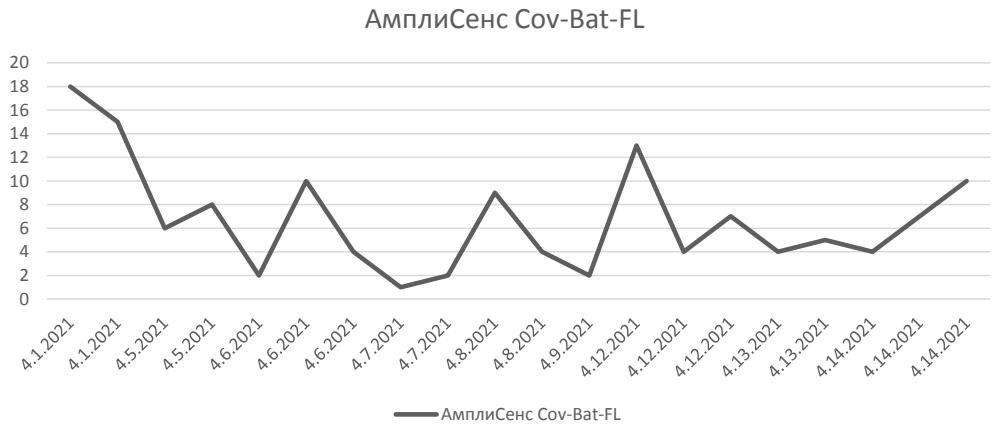


Рис. 2. Динамика положительных результатов на системе АмплиСенс Cov-Bat-FL

На системе COVID-2019 Amp (РЗН 2020/10498 РУ) ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера выполнено 1920 образцов за период с апреля по июнь 2021 г., получено 235 положительных результатов (12,2 %) (рис. 3).

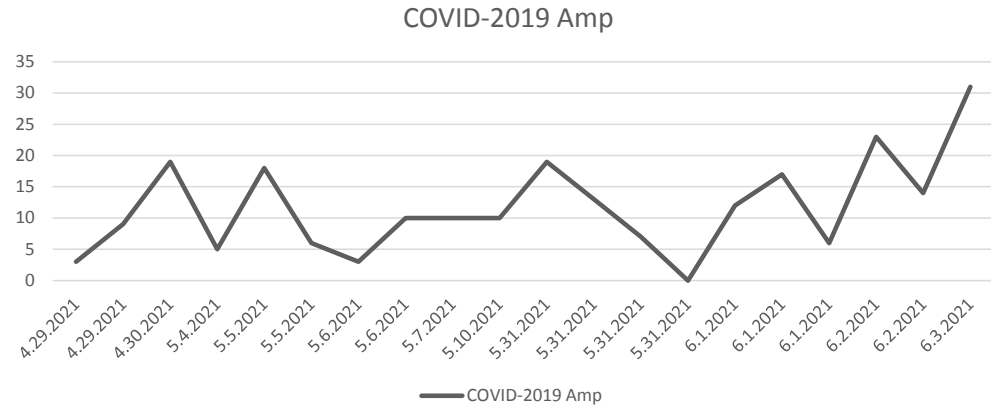


Рис. 3. Динамика положительных результатов на системе COVID-2019 Amp

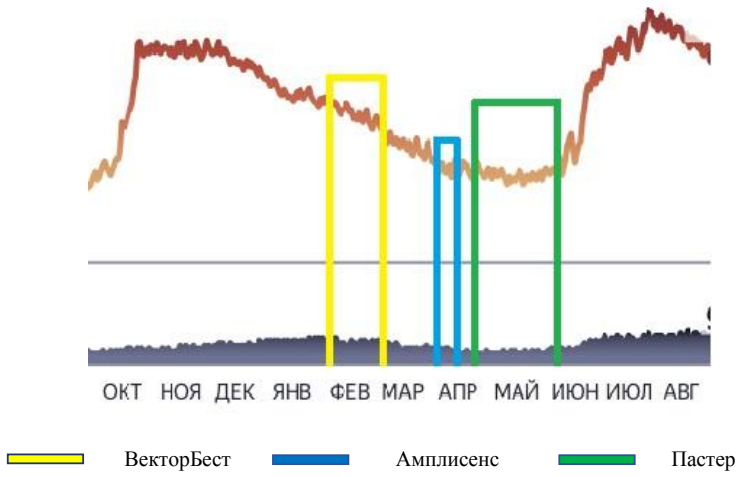


Рис. 4. График распространенности коронавирусной инфекции в Новосибирской области в период с октября по август 2021 г.

Обсуждение

При анализе положительных результатов на разных тест-системах, на РеалБест SARS-CoV-2 (АО «Вектор-Бест») было получено больше положительных результатов (17,9 %), чем на системах COVID-2019 Amp (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 12,2 %) и АмплиСенс Cov-Bat-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 7 %). Однако анализируя данные о распространенности коронавирусной инфекции в Новосибирской области отмечено, что в феврале 2021 г. регистрируется начало снижения волны распространенности до конца апреля 2021 г. со стабилизацией на протяжении мая. В июне отмечается очередной прирост количества положительных образцов по результатам ПЦР исследования, что отражается на общем графике распространенности заболевания в этом месяце в Новосибирской области. Таким образом можно сделать вывод, что процент положительных результатов в выборке образцов обуславливается не тест-системой, а волновым характером течения коронавирусной инфекции (рис. 4).

СИНТЕЗ S, N-ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ КАМФОРНЫЙ ФРАГМЕНТ, И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ*

В. В. Орешко[1,2], К. С. Ковалева[1], Н. И. Бормотов[3], Л. Н. Шишкина[3], С. С. Борисевич[4], О. И. Яровая[1], Н. Ф. Салахутдинов[1]

[1]*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[2] *Новосибирский государственный университет*
[3]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[4]*Уфимский институт химии УФИЦ РАН*

E-mail: vladoreshko@nioch.nsc.ru

Аннотация

В ходе работы был синтезирован набор соединений, содержащих S, N-гетероциклический и камфорный фрагмент с различными заместителями в гетероцикле, которые продемонстрировали значительную активность в отношении вируса осповакцины.

В медицинской химии природные соединения часто используются в качестве стартовых молекул в синтезе новых биологически активных веществ. Актуальность такого подхода подтверждена значительными исследованиями в области поиска новых противовирусных средств, проведенными ранее в отделе медицинской химии НИОХ СО РАН. В нашей работе стартовым объектом является бициклический терпеноид камфора.

В связи с текущей пандемией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, синтез доступных противовирусных средств особенно актуален, поэтому задачей данного исследования является поиск новых противовирусных агентов на основе камфоры. Исходя из того, что при объединении двух фармакофорных групп активность получившегося соединения может в значительной степени измениться, была поставлена задача синтезировать соединения, включающие в структуру борнановый фрагмент и S, N-содержащие гетероциклические структурные блоки, а также изучить их противовирусные свойства.

В ходе работы из камфоры был получен ее гидразон (1), который вводился в реакции с различными изотиоцианатами. В результате был получен набор тиосемикарбазонов (2) с хорошими выходами. Следующим этапом были проведены реакции циклизации, в результате которых были получены камфоро-содержащие 2-иминотиазолидин-4-оны (3) и 2,3-дигидротиазолы (4) с различными заместителями в гетероциклическом фрагменте (см. схему). Все выделенные соединения были охарактеризованы полным набором физико-химических и спектральных данных, суммарный выход соединений составляет от 70 до 95 %.

Для полученных в этой работе веществ была изучена противовирусная активность в отношении вируса осповакцины, которая является родственным вирусу оспы. Вирус натуральной оспы является высокозаразной вирусной инфекцией, передающейся воздушно-капельным путем. Считается, что данное заболевание ликвидировано с 1980 г., после успешной программы всемирной вакцинации. Обязательная вакцинация против оспы была отменена, однако в связи с этим население все чаще становится восприимчивым к родственным заболеваниям.

Большая часть синтезированных соединений проявила активность в отношении вируса осповакцины. Химиотерапевтические индексы в отношении вируса осповакцины (SI) для 2-имино-тиазолидин-4-онов оказались менее 10, однако для 2,3-дигидротиазолов были значительно выше. Так, было найдено соединение лидер, индекс селективности которого составил 54,8, также оно обладает малой токсичностью, что, несомненно, является большим плюсом.

Кроме того, нами была оценена аффинность исследованной библиотеки по отношению к потенциальному сайту связывания, расположенному в рецептор связывающем домене (RBD) поверхностного вирусного белка S-спайк SARS-CoV-2. Согласно результатам расчета гетероциклические производные связываются в интерфейсе контакта RBD и ангиотензинпревращающего фермента 2 и тем самым могут препятствовать проникновению вируса в клетку-хозяина.

Это делает синтезированные соединения перспективными противовирусными агентами.

© В. В. Орешко, К. С. Ковалева, Н. И. Бормотов, Л. Н. Шишкина, С. С. Борисевич, О. И. Яровая, Н. Ф. Салахутдинов, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60038.

АНАЛИЗ ПРОЦЕНТА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СЕЗОНА *

В. А. Помулев, О. П. Хрипко, И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: vapomulev@frcftm.ru

Аннотация

«Дельта»-штамм коронавируса SARS-CoV-2, являющийся возбудителем инфекционного заболевания COVID-19, имеет ряд мутаций в гене S-белка, которые были впервые описаны в Индии в декабре 2020 г. Авторы представляют результаты диагностики COVID-19 проводившейся методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, с января 2021 г., структурированная по разным возрастным группам и анализируют процесс изменения заболеваемости COVID-19, в связи появлением нового «Дельта»-штамма коронавируса SARS-CoV-2.

Цель работы

Волнообразное проявление COVID-19 обуславливает потребность в анализе статистических показателей, позволяющих зафиксировать закономерности в течение заболевания по соответствующим возрастным группам в зависимости от сезона.

С апреля 2020 г. ФИЦ ФТМ проводит лабораторную диагностику COVID-19 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в биологических материалах, поступающих как из моноинфекционных госпиталей, так и из лечебных учреждений Новосибирской области. Впервые «дельта»-штамм был описан в декабре 2020 г. [1], но нами рассматривается выборка более позднего периода, так как активность «дельта»-штамма была зафиксирована в других регионах в апреле 2021 г. [2].

С января 2021 г. по 31 августа 2021 г. лабораторией было проведено 80556 исследований. Биологический материал для диагностики был направлен широким кругом лечебных учреждений Новосибирской области, что позволяет считать данную выборку репрезентативной.

В связи с тем, что авторами предполагается, что дельта-штаммом болеют более молодые люди, структурирование по возрастным группам, позволяет проследить наличие или отсутствие указанной взаимосвязи.

Результаты анализа в процентах приведены на рис. 1 и структурирован по следующим возрастным группам: от 0 месяцев до одного месяца; от одного месяца до одного года; от одного года до шести лет; от шести лет до шестнадцати лет; от шестнадцати лет до двадцати пяти лет; от двадцати пяти лет до сорока лет; от сорока лет до шестидесяти пяти лет; шестьдесят пять плюс, абсолютные значения приведены на рис. 2.

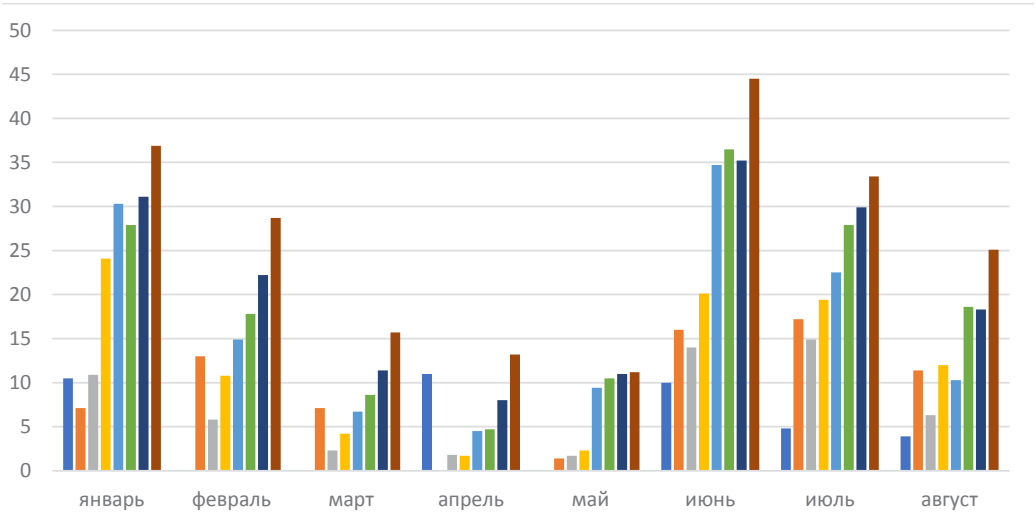


Рис. 1. Количество положительных результатов в каждой из возрастных групп (%)

© В. А. Помулев, О. П. Хрипко, И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, 2021

* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

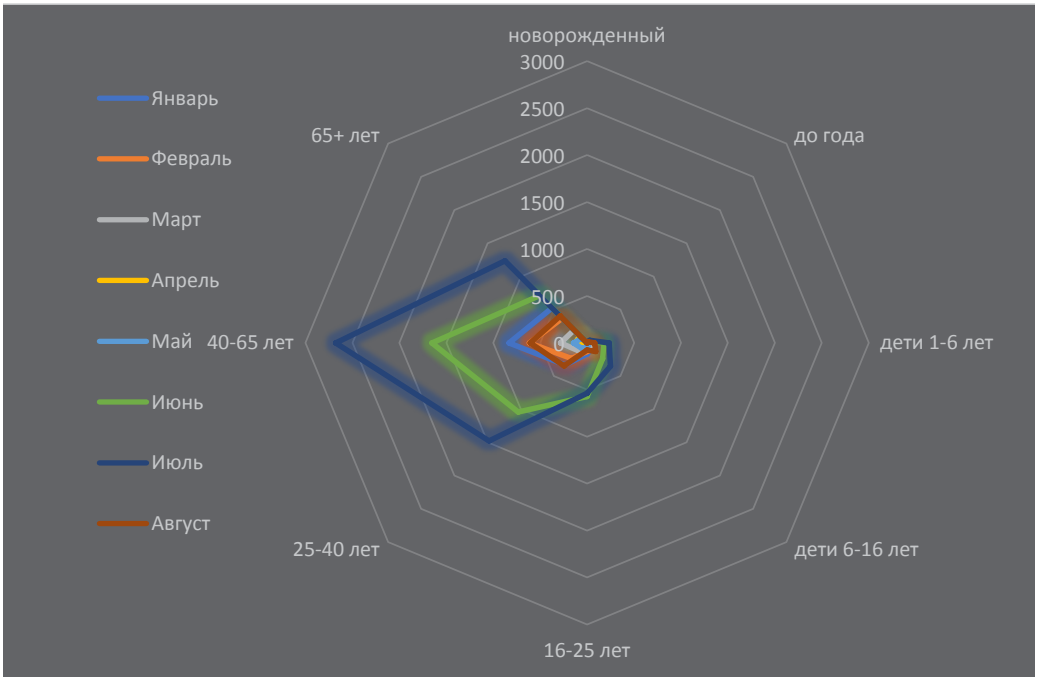


Рис. 2. Количество положительных результатов в каждой из возрастных групп (в абсолютных числах)

Таким образом, анализ данных лабораторной диагностики, проведенной ФИЦ ФТМ, позволяет утверждать, что прямой зависимости проявления вирусоносительства в разных возрастных группах от генотипа штамма не обнаружено, но выявлена зависимость от сезона. Так, в марте, апреле и мае наблюдается снижение проявления вирусоносительства во всех возрастных группах, тогда как в июне, июле и августе наблюдается возврат к показателям января–февраля. Мы предполагаем, что это связано с активностью сезонных вирусных инфекций.

Литература

1. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека // Дюжина вопросов о «дельта»-штамме. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=18610.

2. *Lustig Yaniv, Zuckerman Neta, Nemet Ital et al.* Neutralising capacity against Delta (B.1.617.2) and other variants of concern following Comirnaty (BNT162b2, BioNTech/Pfizer) vaccination in health care workers, Israel // Euro Surveill. 2021. Vol. 26(26). pii=2100557. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.26.2100557

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ SARS-COV-2*

Е. О. Примакова, Е. О. Овчинникова, И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, О. П. Хрипко

Федеральный исследовательский центр Фундаментальной и Трансляционной Медицины, Новосибирск

E-mail: 20katrin@mail.ru

Аннотация

В данной статье рассматривается корреляция авидности антител у пациентов с SARS-CoV-2 и смертности. В ходе исследования обнаружилось, что низкая авидность антител может говорить о несовершенном иммунном ответе и тяжелом течении заболевания.

Введение

Влияние высокоинтенсивного иммунитета на коронавирусную болезнь 2019 (COVID-19) остается неясным. Антитела против SARS-CoV-2 преимущественно индуцируются у стационарных пациентов разной степени тяжести по сравнению с амбулаторными пациентами. В этом исследовании изучалось динамика образования антител против SARS-CoV-2 и изменения авидности антител у стационарных пациентов с COVID-19.

Цели и задачи исследования

Изучить ассоциацию между авидностью антител у пациентов с ковидной инфекцией и смертностью.

Материалы и методы

Сформирована случайная выборка пациентов (n = 30), находящихся на лечении в ковидном госпитале г. Новосибирска. Выполнен трехкратный забор венозной крови с интервалом между манипуляциями от 7 до 10 дней. Исследования антител и их авидности проводили в клинико-диагностическом центре ФИЦ ФТМ.

Результаты

Проведен ретроспективный анализ данных авидности антител у пациентов с коронавирусной инфекцией в динамике. На основании данных о авидности антител на третьем заборе крови, пациенты поделены на 3 группы: с низкой, умеренной и высокой авидностью. В каждую группу были включены 10 пациентов. Медианы авидности антител в каждой группе представлены в табл. 1.

Таблица 1

№ группы	Медиана авидности антител, %		
	$I_{забор}$	$II_{забор}$	$III_{забор}$
I	0	0	4
II	7	42	57
III	8	92	100

Выполнен анализ смертности пациентов среди 3-х групп с разным уровнем авидности антител. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Показатель	Процент авидности антител		
	Низкая (0–10 %)	Средняя (11–57 %)	Высокая (58–100 %)
Смертность, *n*	1	0	0

Обсуждение

Низкая авидность антител может говорить о несовершенном иммунном ответе и, как следствие, вызывать более тяжелое и длительное течение заболевания, с большим объемом поражения всех органов и систем. Анализируя данные об авидности антител на начальном этапе, и к концу заболевания, четко прослеживается увеличение авидности антител независимо от исходного уровня, как и должно быть при нормальном течении инфекционного процесса. Полученные данные о смертности свидетельствуют о том, что при низкой авидности антител класса IgG, COVID-19 протекает в более тяжелой форме, более длительно и выше вероятность летальных исходов.

© Е. О. Примакова, Е. О. Овчинникова, И. Ю. Деулин, Ю. И. Хрипко, О. П. Хрипко, 2021

* Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАЗИДИОМИЦЕТА ТРУТОВИКА НАСТОЯЩЕГО *FOMES FOMENTARIUS*

М. А. Проценко, Е. И. Филиппова, Т. В. Теплякова, О. А. Серова, Н. А. Мазуркова

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

E-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Аннотация

Показано, что этанольный экстракт, полученный из культивируемого мицелия *Fomes fomentarius* (L.) Fr., выращенного в глюкозопептонной среде, проявляет вируснейтрализующую активность в отношении вируса простого герпеса 2-го типа и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) *in vitro* и вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) *in vivo*.

Со времен Древней Греции трутовики использовали как материал для кровоостанавливающих повязок. В Китае отваром *Fomes fomentarius* лечили рак пищевода, желудка и матки. Водный экстракт гриба нормализует уровень глюкозы в крови и липидный обмен [1], а этанольный экстракт показал железо-восстанавливающую способность [2]. Мицелий *Fomes fomentarius* проявляет противовирусный эффект в отношении вируса гриппа А субтина H1N1 [3].

Достижения в области биотехнологии привели к созданию культивируемых штаммов многих базидиальных грибов, в том числе *Fomes fomentarius*. В коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора сотрудниками лаборатории микологии депонирован штамм *Fomes fomentarius* Кр-112.

Глубинное культивирование базидиального гриба *Fomes fomentarius* штамма Кр-112 (F-1261) проводили в глюкозопептонной среде, на среде с крахмалом и кукурузным экстрактом, и на среде с мелассой и кукурузным экстрактом на круговых качалках при скорости вращения 190 об/мин, при температуре 26±2 °С, инкубируя в течение 7 суток. Отмечено, что наибольший выход сухой биомассы наблюдался при глубинном культивировании в питательной среде с крахмалом и кукурузным экстрактом.

Из выращенного мицелия получали сухие этанольные и водные экстракты. Экстракты анализировали на содержание белков, полисахаридов, фенольных соединений и флавоноидов по разработанным нами ранее методикам [4].

Показано, что экстракты из мицелия *Fomes fomentarius*, выращенного в глюкозопептонной среде, показали наивысшую антиоксидантную активность в реакции окисления Твин-80 кислородом.

Индекс нейтрализации вируса простого герпеса 2-го типа под действием этанольных экстрактов составлял от 1,5 до 2,0 lg. При этом, индекс нейтрализации вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием этанольного экстракта мицелия, выращенного в глюкозопептонной среде, составил 2,0 lg. В опытах *in vivo* выявлена противовирусная активность этого экстракта при введении исследуемого препарата мышам, инфицированным вирусом гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2).

Результаты исследования позволяют сделать вывод, что этанольный экстракт из мицелия *Fomes fomentarius,* выращенного в *глюкозопептонной среде,* может являться источником для создания эффективных и безопасных противовирусных лекарственных препаратов.

Литература

1. Lee J. Effects of Fomes fomentarius supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats // Nutrition Research. 2005. V. 25. No 2. P. 187–195.

2. Ковалева А. В., Кузьминых О. В., Лащенко Е. Ю. и др. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих макромицетов // Вісник Донецького національного університету. 2013. № 1. С. 136–139.

3. Круподерова Т. А., Барштейн В. Ю., Рыбалко С. Л. Противовирусная активность мицелия базидиальных грибов в отношении вируса гриппа в экспериментах *in vitro* // Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 312–314.

4. Проценко М. А., Костина Н. Е., Теплякова Т. В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба Daedaleopsis tricolor (Bull.) Bondartsev et Singer // Биотехнология. 2018. Т. 34. № 1. С. 45–51.

© М. А. Проценко, Е. И. Филиппова, Т. В. Теплякова, О. А. Серова, Н. А. Мазуркова, 2021.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РИНОВИРУСА A28 ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ КСЕНОАНТИГЕНОВ

Л. А. Пятавина[1,2], И. Р. Иматдинов[1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: l.pyatavina@g.nsu.ru

Аннотация

Риновирусы являются безопасной и перспективной платформой для использования в качестве векторной системы, в связи с этим в рамках данной работы разработана система для обратной генетики риновируса A28. Полученные генетические конструкции позволяют получать рекомбинантные штаммы риновируса A28 экспрессирующие гетерологичные антигены.

Векторные вакцины показали свою эффективность и безопасность, в связи с чем получили широкое применение для профилактики заболеваний человека и животных. Однако, несмотря на достоинства, у векторных вакцин имеется недостаток связанный с формированием иммунного ответа на вирусный вектор, что осложняет ревакцинацию. В связи с вышесказанным, основная задача заключается в разработке новой векторной системы, с возможностью модификации антигенного компонента вектора для исключения влияния предсуществующего иммунитета.

Рекомбинантные риновирусы, в качестве векторных систем, имеют ряд преимуществ, таких как: безопасность и естественная тропность к верхним дыхательным путям; оптимальная температура репродукции 32–35 °C, что минимизирует вероятность осложнений на нижние дыхательные пути; охарактеризовано более двухсот серотипов, что позволяет варьировать антигенные компоненты векторной системы, в зависимости от циркулирующих серотипов на территории данного региона.

Целью работы являлась разработка системы для обратной генетики риновируса A28. Подбор вырожденных олигонуклеотидных праймеров проведен на основании референсных последовательностей риновирусов серотипов A16, A28, A68, депонированных в базе данных GenBank (KX891411, DQ473508, FJ445150). Амплификацию фрагментов генома проводили из инактивированного вируссодержащего материала, любезно предоставленного сотрудниками лаборатории. Обратная транскрипция выполнена с использованием коммерческого набора RNAskribe RT (Biolabmix, Россия). Амплификация фрагментов генома проводилась с применением высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, США) согласно рекомендациям производителя. После чего продукты амплификации анализировали методом гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

В последующем, выделенные из геля фрагменты вирусного генома, были субклонированы в плазмидном векторе pJet1.2. Скрининг клонов-трансформантов *E. coli* выполнен с использованием методов ПЦР и рестрикционного анализа. Полученные рекомбинантные плазмиды секвенировали по методу Сэнгера для определения нуклеотидных последовательностей (3500 Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific).

Биоинформатический анализ последовательностей позволил определить исходную нуклеотидную последовательность изолята BEI21 риновируса A28. На основании полученной референсной последовательности, для обеспечения экспрессии ксеноантигенов, проведен биоинформатический дизайн генетических конструкций для получения рекомбинантных штаммов риновируса A28. Полноразмерная кДНК копия генома риновируса A28 изолята BEI21 клонирована по методу Гибсона в плазмидном векторе pHRV_A28_wt. Функциональная активность полученных конструкций будет изучена в ходе изучения свойств рекомбинантного репликационно-дефектного риновируса, обеспечивающего экспрессию репортерного гена.

Таким образом, получены генетические конструкции позволяющие направленно модифицировать кДНК копию генома риновируса A28 с целью генетической аттенуации и экспрессии ксеноантигенов.

© Л. А. Пятавина, И. Р. Иматдинов, 2021

РАСПРОСТРАНЕНИЕ DELTA-ВАРИАНТА SARS-COV-2 И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В МОСКВЕ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю. С. Смирнова[1], Г. В. Роев[1], В. Г. Акимкин[1], А. С. Сперанская[1], А. Б. Комиссаров[2], Д. А. Лиознов[2], А. Г. Богун[3], И. А. Дятлов[3], М. В. Храмов[3], А. Е. Самойлов[1], М. И. Надтока[1], С. Ю. Селезов[1], С. О. Синицын[1], Е. В. Корнеенко[1], А. С. Черкашина[1], К. Ф. Хафизов[1], Н. И. Борисова[1], В. В. Каптелова[1], С. С. Саенко[1], А. Г. Голубева[1], М. И. Зотова[1], Ю. Ю. Берлина[1], Е. Д. Соловьёва[1], А. В. Валдохина[1], В. П. Буланенко[1], О. Ю. Шипулина[1], Л. Ю. Кондрашева[1], Д. В. Дубоделов[1], И. Г. Шемякин[3], В. И. Соломенцев[3], А. А. Сизова[3], Л. А. Шишкина[3], А. А. Кисличкина[3], А. Ю. Лебедева[3], А. Е. Курилова[3], Ю. П. Скрябин[3], С. А. Благодатских[3]

[1] Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва
[2] НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург
[3] Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, р. п. Оболенск

E-mail: smirnova.y@cmd.su; roevherman@gmail.com

Аннотация

Геновариант B.1.617.2 (по классификации Pangolin), также называемый Delta, идентифицирован как 21A clade (по классификации Nextstrain). В мае 2021 г. Delta стал «вариантом, вызывающим беспокойство» (VOC) по классификации ВОЗ. Delta вариант имеет мутации в гене, кодирующем S-белок, отвечающие за замены D614G, T478K, P681R и L452R. Позднее приобрел мутации K417N, V70F, W258L, в результате чего получил название Delta Plus, что соответствует исключительно новому варианту. Также, присутствуют несколько мутаций, характерных и для первоначального варианта B.1.617.2, однако они значительно больше распространены в Delta Plus. На настоящий момент известно по крайней мере о тринадцати новых линиях Delta Plus: AY.1–AY.12.

С момента первого появления в России в последней декаде марта 2021 г., геновариант Delta быстро стал доминирующим в Москве и Московской области (МО). В настоящее время (конец августа 2021 г.) Delta доминирует на всей территории РФ. Однако отсутствует информация о том, какие новые линии из перечисленных выше Delta Plus, распространяются в настоящее время.

Материалы и методы

В июне 2021 г. был зарегистрирован портал VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). По данным на 26 августа 2021 г. на него выложено более 24 тыс. последовательностей, как полногеномных (далее WG), так и фрагментных сиквенсов S-белка. В анализе использовали только те последовательности, которые получены в результате секвенирования образцов от пациентов из Москвы и МО, собранных в 2021 г.

Для определения геновариантов фрагментных и WG последовательностей был использован алгоритм PARuS, имплементированный в портал. Алгоритм сопоставляет мутации, найденные в исследуемом образце, с характерными мутациями в S-гене для каждого рассматриваемого геновариантa.

Отобранные с помощью PARuS полногеномные последовательности, относящиеся к Delta, исследовали с помощью Pangolin, анализирующий только полные геномы.

Основная часть

Для анализа было сформировано две выборки последовательностей SARS-CoV-2 от пациентов из Москвы и МО. Первая включала в себя 5514 последовательности, как фрагментные, так и WG. Результат анализа геновариантов алгоритмом PARuS см на рис. 1. Выборка полногеномных последовательностей Delta (линия B.1.617.2, а также все AY.*) составила 1497 последовательностей. Результат анализа Pangolin приведен на рис. 2.

Из рис. 1 видно, что вариант Delta начал вытеснять остальные варианты в апреле 2021 г. Как видно из рис. 2, с первой половины мая активно распространялась линия AY.12, и к настоящему моменту AY.4. Линии AY.12 и AY.4 отличаются друг от друга незначительно: для линии AY.12 характерна мутация в гене ORF1a K261N. Для линии AY.4 характерны мутации в гене ORF1a A2529V, в S-гене — G142D. Поэтому возможно, что часть образцов, определившихся Pangolin'ом как AY.12, относятся к линии AY.4, и наоборот.

Помимо этого в незначительном количестве была обнаружена линия AY.6, которая, однако, широкого распространения не получила.

© Ю. С. Смирнова, Г. В. Роев, В. Г. Акимкин, А. С. Сперанская, А. Б. Комиссаров, Д. А. Лиознов, А. Г. Богун, И. А. Дятлов, М. В. Храмов, А. Е. Самойлов, М. И. Надтока, С. Ю. Селезов, С. О. Синицын, Е. В. Корнеенко, А. С. Черкашина, К. Ф. Хафизов, Н. И. Борисова, В. В. Каптелова, С. С. Саенко, А. Г. Голубева, М. И. Зотова, Ю. Ю. Берлина, Е. Д. Соловьёва, А. В. Валдохина, В. П. Буланенко, О. Ю. Шипулина, Л. Ю. Кондрашева, Д. В. Дубоделов, И. Г. Шемякин, В. И. Соломенцев, А. А. Сизова, Л. А. Шишкина, А. А. Кисличкина, А. Ю. Лебедева, А. Е. Курилова, Ю. П. Скрябин, С. А. Благодатских, 2021

Наряду с перечисленными последовательностями Delta Plus, первоначальный вариант Delta B.1.617.2 также продолжает циркулировать в МО.

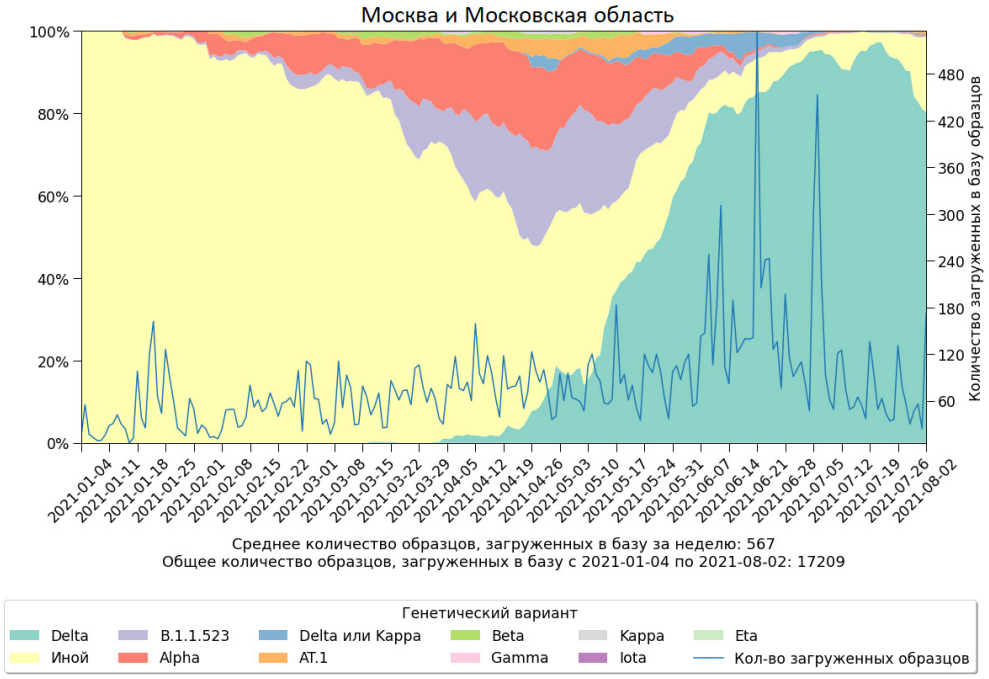


Рис. 1. Распространение геновариантов SARS-CoV-2 в Москве и МО. Изображена скользящая средняя (период усреднения — 7 дней). «Иной» — геновариант, которые не попадают в категорию VOC и VOI (по классификации ВОЗ)

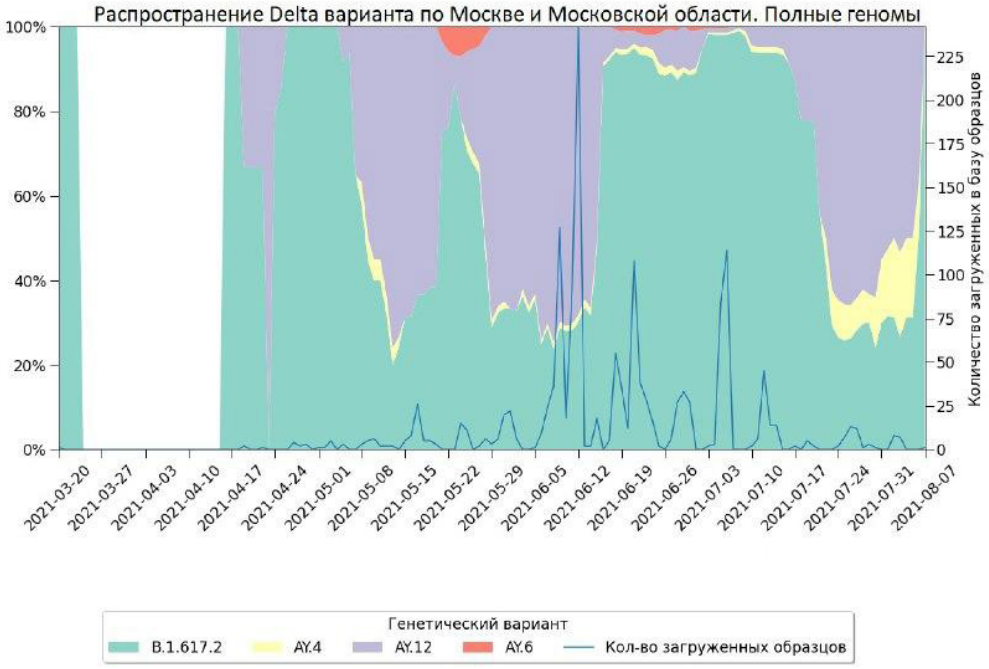


Рис. 2. Распространение линий эволюции геновариантa Delta SARS-CoV-2 в Москве и МО. Изображена скользящая средняя (период усреднения — 7 дней)

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС КОРИ КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН

Т. В. Сульгина, И. Р. Иматдинов

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

E-mail: sulgina_tv@vector.nsc.ru

Аннотация

По данным ВОЗ в 2020 г. более 23 млн детей не прошли плановую иммунизацию против инфекционных заболеваний в связи с пандемией коронавирусной инфекции COVID-19. Для предотвращения спонтанных вспышек высококонтагиозных эпидемических болезней важное значение приобретает разработка комбинированных вакцинных препаратов для профилактики нескольких заболеваний. Одной из перспективных вакцинных платформ является векторная система на основе вакцинных штаммов вируса кори. В рамках данной работы были разработаны генетические конструкции для получения рекомбинантных штаммов вируса кори, способных при репродукции синтезировать ксеноантигены.

На территории стран Евразийского экономического сообщества высокоаттенуированный штамм «Ленинград-16» (Л-16) вируса кори используется в вакцинных препаратах с 60-х гг. XX в. Столь длительное применение штамма «Ленинград-16» вируса кори объясняется его эффективностью, безопасностью и отсутствием побочных эффектов, а также возможных отдаленных последствий. Таким образом, вакцинный штамм «Ленинград-16» вируса кори является перспективной платформой для создания комбинированных векторных вакцин.

Целью данной работы являлись получение методами обратной генетики и изучение свойств рекомбинантного прототипного штамма вируса кори в качестве векторной системы для экспрессии ксеноантигенов.

Для получения генетических конструкций, кодирующих полноразмерный геном вируса кори штамм «Ленинград-16», осуществляли постановку обратной транскрипции и амплификации методом ПЦР согласно схеме, приведенной на рисунке. Сборку амплифицированных фрагментов кДНК копий генома вируса кори и репортерного гена флуоресцентного белка mNeonGreen проводили по методу Гибсона в векторе pStem. Для получения трех хелперных плазмид была выполнена амплификация генов N, P, L вируса кори, кодирующих белки репликативной машинерии вируса и их последующее клонирование в экспрессирующий плазмидный вектор pStem.

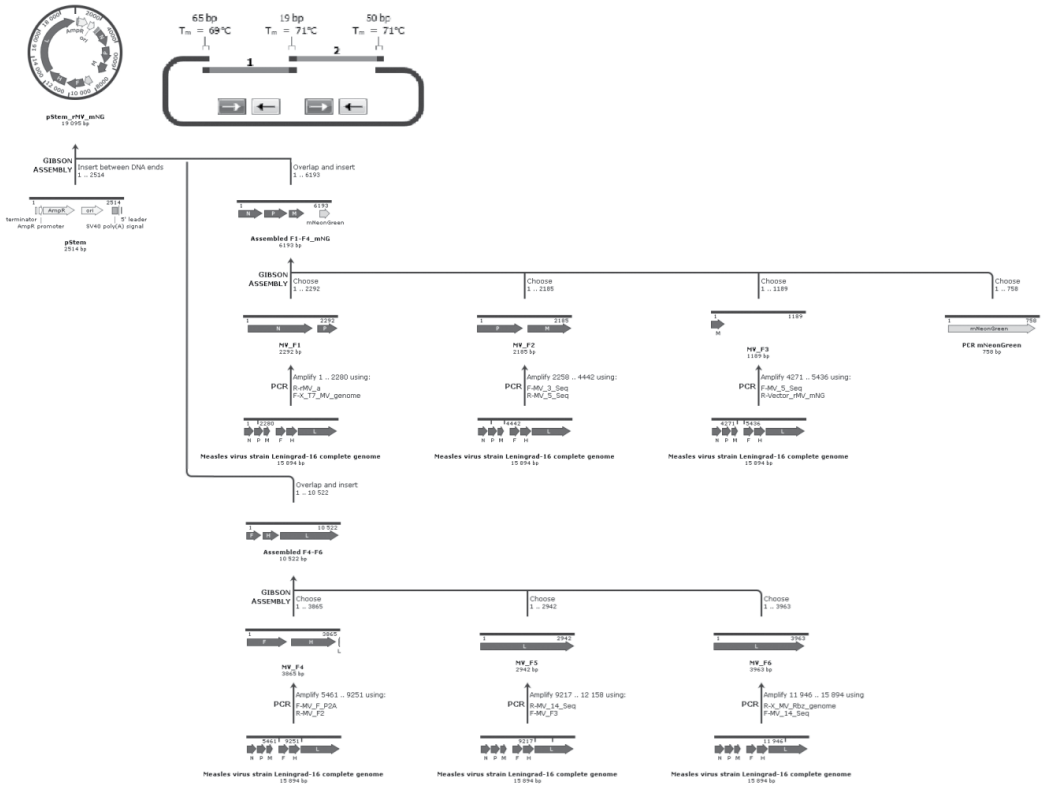


Схема сборки плазмидного вектора pStem_rMV_mNG для обратной генетики вируса кори штамм «Ленинград-16»

©Т. В. Сульгина, И. Р. Иматдинов, 2021

Получение рекомбинантного прототипного штамма вируса кори проводили с использованием методов обратной генетики в перевиваемой линии клеток 4647. Эффективность проведенной трансфекции оценивали по образованию характерного синцития в монослое клеток (синтез вирусных гликопротеинов F и H), а также детекции в клетках при флуоресцентной микроскопии белка mNeonGreen.

Инфекционную активность рекомбинантного штамма вируса кори оценивали при постановках классических вирусологических методов титрования в чувствительной культуре клеток 4647, с выражением в 50 % тканевых цитопатических дозах (ТЦД50). При изучении культуральных свойств установлено, что полученный прототипный штамм сохранил основные свойства исходного штамма «Ленинград-16» вируса кори (клеточная чувствительность, характер цитопатического действия, оптимальные параметры культивирования и др.).

Таким образом, разработанная система для обратной генетики может быть использована для получения рекомбинантных штаммов вируса кори, обеспечивающих экспрессию гетерологических антигенов с целью формирования защиты против двух или более инфекционных заболеваний. Стоит отметить, что при этом рекомбинантные штаммы сохраняют свойства исходного вакцинного штамма «Ленинград-16» вируса кори.

МИНИГЕНОМНАЯ СИСТЕМА ВИРУСА ПУУМАЛА

А. Е. Тишин, И. Р. Иматдинов

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

E-mail: tishin_ae@vector.nsc.ru

Аннотация

Вирус Пуумала является одним из возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). На сегодняшний день вирус Пуумала остается малоизученным патогеном, что затрудняет разработку эффективных вакцинных препаратов и специфических средств терапии. Перспективным инструментом изучения организации генома, молекулярных механизмов патогенеза, а также цис- и транс-элементов белковой машинерии являются безопасные минигеномные системы. В рамках данной работы получены синтетические кДНК копии сегментов вируса Пуумала, на основе которых создана функциональная минигеномная система, необходимая для высокопроизводительного скрининга специфических противовирусных препаратов, а также для прототипирования вакцинных препаратов нового поколения.

Вирус Пуумала (PUUV) — представитель рода *Orthohantavirus* семейства *Hantaviridae* порядка *Bunyavirales,* естественным резервуаром-переносчиком которого является рыжая полевка (*Myodes glareolus)*. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — это острая вирусная зооантропонозная инфекция, вызываемая представителями рода *Orthohantavirus*. Российская Федерация занимает второе место в мире по количеству случаев ГЛПС. Вирус Пуумала является основным возбудителем ГЛПС на территории РФ, более 90 % случаев заболевания приходятся на этот вирус.

На сегодняшний день в мире существует ряд вакцинных препаратов, направленных на специфическую профилактику ГЛПС различной этиологии, их использование одобрено в Китае, Южной и Северной Корее. Однако данные инактивированной вакцины разработаны на основе хантавирусов Хантаан и Сеул и не способствуют формированию протективного иммунитета против PUUV.

В рамках данной работы проведена разработка безопасной минигеномной системы PUUV. Для этого проведен синтез кДНК копий S- и L-сегментов комбинацией методов сборочной полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции с перекрывающимися концами. S- и L-сегменты были клонированы в плазмидном векторе для обратной генетики nStem_T7p. Для функциональной детекции в ген N S-сегмента был помещен репортерный ген красного флуоресцентного белка DsRed-Express, а также P2A-пептид для отщепления фенотипического маркера в процессе трансляции. Гены N и RdRp были клонированы в плазмидном векторе nStem_T7p_IRES, включающий внутренний участок посадки рибосомы (IRES) EMCV, необходимый для кэп-независимой трансляции белков репликативной машинерии.

Проведение исследований с использованием минигеномной системы осуществлено посредством трансфекции монослоя клеточной линии BHK-21/13 конструкциями nStem_T7p-PUUV_DsRed_S, nStem_T7p_IRES-PUUV_N, nStem_T7p_IRES-PUUV_RdRp и плазмидой pCAG-T7pol, кодирующей ДНК-зависимую РНК-полимеразу фага Т7 (получена ранее в лаборатории). Синтез вирусных белков нуклеопротеина и RdRp, необходимых и достаточных для транскрипции и репликации искусственного вирусного сегмента S_DsRed, обеспечивался за счет вспомогательных конструкций nStem_T7p_IRES-PUUV_N и nStem_T7p_IRES-PUUV_RdRp. Спустя 48 часов в клетках, трансфецированных полным комплексом генетических конструкций, отмечали высокий уровень экспрессии DsRed-Express, в то время как в контрольных постановках синтез репортерного гена не выявлен. Высокий уровень экспрессии репортерного гена в трансфецированных клетках указывает на синтез функциональных вирусных белков N и RdRp, а также эффективную транскрипцию синтетического S-сегмента с аутентичными 5’ — 3’-концами.

Разработанная минигеномная система позволит расширить фундаментальные знания о молекулярных механизмах вирус-клеточного взаимодействия PUUV, провести скрининг нуклеозидных аналогов, направлено модифицировать сегменты вирусного генома для функционального изучения доменов вирусных белков, а также для прототипирования рекомбинантных вакцин с контролируемым циклом репликации.

© А. Е. Тишин, И. Р. Иматдинов, 2021

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ КОТЯТ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ SARS-COV-2

А. Ю. Филиппова[1], М. С. Федотова[1], К. С. Юрченко[2], М. А. Гуляева[2], А. М. Шестопалов[2]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*

E-mail: m.fedotova@g.nsu.ru

Аннотация

SARS-Cov-2 — вирус, способный вызывать тяжелую острую респираторную инфекцию и являющийся одной из самых актуальных проблем на сегодняшний день. Его влияние на различные органы и ткани организма по-прежнему вызывает много вопросов. Данное исследование позволяет оценить патоморфологические изменения и посмотреть течение инфекции, используя чувствительную модель млекопитающих, тесно контактирующих с человеком.

Цель исследования заключалась в изучении патоморфологических изменений в органах модельных животных — Felis silvestris catus, при экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2.

Исследование проводилось на модельных животных — Felis silvestris catus. Для работы был взят штамм вируса SARS-Cov-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020, который был наработан на культуре клеток Vero. Шесть котят были разделены на 3 группы. У первой группы исследуемый материал — фрагменты легкого, кишечника, печени — отбирался на 6-е сутки, у второй — на 15-е сутки. Третья группа — контрольная. Первой и второй группам вирус вводился интраназально, 200 мкл, 10^4TCID50/мл. Гистологические срезы, окрашенные гематоксилином, и эозином, и по методу Маллори, исследовали на наличие патоморфологических изменений в тканях методом световой микроскопии.

На 6-е сутки после инфицирования в легких наблюдалось умеренное кровенаполнение кровеносных сосудов различного калибра. Отмечались периваскулярные отеки, нарушение строения эпителиальной выстилки бронхиол, десквамация эпителиоцитов, а также визуальное увеличение количества коллагеновых волокон периваскулярно. Хорошо визуализировались обширные зоны ателектазов, характеризующиеся спаданием альвеол. Наблюдаемые изменения свидетельствовали о развитии интерстициальной пневмонии. На 15-е сутки после инфицирования по-прежнему визуализировались обширные зоны ателектазов и очаги эмфизематозного расширения. В некоторых областях можно было заметить геморрагическое пропитывание ткани легкого, просвет бронхиол также был заполнен большим количеством детрита, состоящего преимущественно из десквамированных эпителиоцитов и небольшого количества эритроцитов. Также наблюдался периваскулярный и перибронхиальный отек.

В тканях тонкого кишечника, изъятых на 6-е сутки, наблюдалась массивная лейкоцитарная инфильтрация, а также было выявлено увеличение количества бокаловидных клеток. Визуализировалась вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов ворсин кишечника. При окрашивании по Маллори было выявлено разрастание соединительной ткани в участках отслоения слизистой оболочки от подслизистого слоя. На 15-е сутки помимо вышеперечисленных изменений наблюдались точечные геморрагии, а также участки некроза, что может свидетельствовать о развитии патологического процесса в тканях.

В печени на 6-е сутки протекания инфекции наблюдались признаки сливной и капельной дистрофии, периваскулярный отек, а также нарушение гемодинамики, о чем свидетельствуют расширенные венозные синусы и сладж эритроцитов в крупных сосудах. На 15-е сутки, в целом, картина не менялась, было видно нарушение гемодинамики, дистрофия гепатоцитов, визуализировались фокусы некроза.

Исследование показало, что заражение вирусом штамма SARS-Cov-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 приводит к нарушениям морфофункционального профиля тканей различных органов, при этом патологические изменения наблюдаются уже на 6-е сутки после инфицирования и становятся более выраженными к 15 суткам.

© А. Ю. Филиппова, М. С. Федотова, К. С. Юрченко, М. А. Гуляева, А. М. Шестопалов, 2021

ЭПИТОПНАЯ СТРУКТУРА РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА P35 ОРТОПОКСВИРУСОВ*

Я. А. Хлусевич, А. Л. Матвеев, Л. А. Емельянова, О. В. Голота, Н. В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: khlusevichjana@mail.ru

Аннотация

Онколитическая виротерапия — революционный инструмент для лечения рака. Одним из таких вирусов применяемых для виротерапии является вирус осповакцины. Но использование онколитических вирусов имеет ряд недостатков, связанных с появлением нейтрализующих антител даже после однократного применения. Поэтому необходимы подходы для снижения иммунного ответа в организме пациента при онколитической виротерапии без снижения онколитических свойств вирусов. Возможным способом решения этой проблемы может быть снижение иммуногенности путем нарушения структуры эпитопов, распознаваемых вируснейтрализующими антителами.

Ранее мы получили полноразмерные антитела человека, способные нейтрализовать различные ортопоксвирусы, и один из вируснейтрализующих эпитопов белка p35 вируса осповакцины, кодируемого OPT H3L, был локализован методами синтетической биологии и фагового дисплея. Было показано, что локализованный вируснейтрализующий эпитоп белка p35 является прерывистым, и аминокислотные остатки в областях 15–19 и 232–237, расположенные на петлях ^{13}VIDRLPSETFPNVHEHINDQKF^{34} и ^{231}DNAAKYVEH^{239}, соответственно, участвуют в связывании. Чтобы понять, какие критические аминокислотные остатки участвуют во взаимодействии с антителами, нейтрализующими вирус, был сконструирован фьюжн-белок, содержащий обе области локализованного эпитопа (1–34 и 228–239), объединенные гибким пептидным линкером. На основе этого комбинированного белка была получена панель из 5 мутантных белков, содержащих замены в обеих областях. Анализ специфичности взаимодействия полученных мутантных вариантов основного иммуногенного белка вируса осповакцины p35 с существующими нейтрализующими полноразмерными антителами человека fh1A и fh8E, распознающими нейтрализующий эпитоп, показал, что внесенные изменения приводят к отсутствию связывания антител. Сыворотки доноров, иммунизированных вирусом осповакцины, выявляли только исходный и один мутантный вариант белка p35 ортопоксвируса в Вестерн-блот анализе. Данные результаты свидетельствуют о том, что для формирования противовирусных антител против белка p35 вируса осповакцины у человека ключевым является участок этого белка с 128 по 239 аминокислотный остаток, и аминокислоты R16, P18, A233. При этом существенной разницы в иммунном ответе у доноров, иммунизированных вирусом осповакцины менее 5 и более 15 лет назад, не было обнаружено. Это свидетельствует о том, что иммунизация вирусом осповакцины вызывает стойкий иммунный ответ против белка p35.

© Я. А. Хлусевич, А. Л. Матвеев, Л. А. Емельянова, О. В. Голота, Н. В. Тикунова, 2021

* Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-00135).

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ОСТАТОЧНОЙ НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТИ НИЗКОАТТЕНУИРОВАННОГО И ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ

О. А. Шамсутдинова[1], И. Н. Лаврентьева[2], Д. Д. Карал-оглы[1]

[1] НИИ медицинской приматологии, Сочи
[2] Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

E-mail: shamsutdinova-o-a@yandex.ru

Аннотация

Проведена сравнительная оценка специфической безопасности низкоаттенуированного и вакцинных штаммов вируса краснухи в опыте на обезьянах вида *Macaca mulatta.* Показана высокая специфичность и чувствительность молекулярно-генетического метода, и возможность его применения в качестве дополнительного теста при изучении уровня аттенуации штаммов вируса краснухи.

Исследование проводили на 10 клинически здоровых обезьянах вида *Macaca mulatta* массой 3–5 кг, родившихся и содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ МП». Обезьяны были рандомизированы на 3 группы методом случайных чисел. Животным I группы (n = 4) интрацеребрально вводили препарат, содержащей низкоаттенуированный штамм «Орлов-14». Обезьянам II группы (n = 4) вводили вакцинный штамм «Орлов-В». Животным третьей группы (n = 2) — вакцинный штамм RA27/3, входящий в состав культуральной живой вакцины против краснухи, производства ФГУП «НПО «Микроген», Россия.

Вируссодержащий материал вводили интрацеребрально в объеме 0,25 мл в зрительный бугор каждого полушария головного мозга по методике, рекомендованной Министерством Здравоохранения РФ для «Оценки специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи» ОФС.1.7.2.0010.15. Доза вакцинных штаммов «Орлов-В» и RA 27/3 вируса краснухи при интрацеребральном введении составляла не менее 10 минимальных прививочных доз человека.

Учитывая, что гистологическое исследование ЦНС обезьян, в тесте интрацеребрального заражения в настоящее время является единственным рекомендованным методом оценки специфической безопасности аттенуированных вакцинных штаммов, было проведено патоморфологическое исследование ЦНС и периферических органов экспериментальных животных. Отмечено выявление менингоэнцефаломиелита на 12-е сутки эксперимента у обезьяны, зараженной низкоаттенуированным штаммом «Орлов-14». Отсутствие поражений, характерных для менингоэнцефаломиелита у двух других животных, на 21 и 28-е сутки после заражения низкоаттенуированным штаммом, мы объясняем меньшей инфекционной дозой вируса, введенного обезьянам.

Полученные результаты вирусологического (культурального) и молекулярно-генетического методов (ПЦР-РВ) показывают, что при низком уровне аттенуации штаммов вируса краснухи (в нашем эксперименте на примере низкоаттенуированного штамма «Орлов-14») при интрацеребральном введении обезьянам, вирус может не только размножаться в клетках ЦНС, распространяться по отделам ЦНС, но и пересекать гематоэнцефалический барьер, поражая периферические органы обезьян. С другой стороны, отсутствие инфекционного вируса в ЦНС и периферических органах обезьян, зараженных вакцинными штаммами, может свидетельствовать в пользу высокого уровня аттенуации штаммов «Орлов-В» и RA27/3 вируса краснухи.

В данной работе мы провели сравнительный анализ результатов, полученных при определении вируса краснухи в исследуемых образцах по ЦПД и методом ПЦР-РВ. Полученные данные указывают на хорошее совпадение результатов. Однако учитывая недостатки классического метода выделения вируса краснухи: длительность, субъективность анализа и зависимость от внешних факторов, выявление вируса краснухи методом ПЦР-РВ имеет ряд преимуществ: специфичность, чувствительность и меньшая длительность реакции. Таким образом, предложенный метод ПЦР-РВ может быть использован в качестве дополнительного теста при доклиническом контроле специфической безопасности аттенуированных вакцинных штаммов живых вакцин.

© О. А. Шамсутдинова, И. Н. Лаврентьева, Д. Д. Карал-оглы, 2021

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ SARS-COV-2 И ВЫЯВЛЕНИЕ КРОССРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ*

О. Н. Шапрова[1], Е. А. Колосова[1,2], Д. В. Шаньшин[1], Д. Н. Щербаков[1,2], Т. Н. Ильичёва[1]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2]*Алтайский государственный университет, Барнаул*

E-mail: shaprova_on@vector.nsc.ru

Аннотация

Были сконструированы антигены CoVN, $S_{717–860}$ и RBD. При помощи разработанных антигенов исследовали 799 сывороток, собранных осенью 2019 г., с целью обнаружения антител способных взаимодействовать с белками SARS-CoV-2.

Первые коронавирусы человека (HCoV-229E и HCoV-OC43) изолированы почти 50 лет назад, еще два сезонных коронавируса (HCoV-NL63 и HCoV-HKU1) выявлены после вспышки SARS-CoV в 2002–2003 гг. SARS-CoV-2, появившийся в конце 2019 г., принадлежит к роду бета-коронавирусов и более тесно связан с HKU1 и OC43, чем с альфа-коронавирусами 229E и NL63. Наблюдения, основанные на изучении электронных медицинских записей, показали, что ранее существовавшие иммунные ответы против сезонных коронавирусов человека вероятно не защищают от заражения, но могут смягчить проявления заболевания, вызванного инфекцией SARS-CoV-2.

Для обнаружения кроссреактивных антител нами были сконструированы следующие антигены: $S_{717–860}$ фрагменты белка S, CoVN, соответствующий полноразмерному вирусному нуклеокапсидному белку N и RBD, соответствующий рецептор-связывающему домену. Белки $S_{717–860}$ и CoVN рассматривали как маркеры возможного наличия заболевания, а RBD — как фактор протективного иммунного ответа.

Было изучено 799 образцов сыворотки крови, собранной сотрудниками Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации в Сибирском федеральном округе в октябре–ноябре 2019 г.

С химерными белками проводили твердофазный иммуноферментный анализ с использованием пероксидазного конъюгата козьих антител Anti-Human IgG (полноразмерная молекула). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку, полученную в 2017 г., в качестве положительного контроля — сыворотку переболевшего COVID-19, чей диагноз был подтвержден данными ПЦР-анализа.

Каждую сыворотку наносили в двух повторах, а значения оптической плотности приводили к общему среднему. Сыворотку считали положительной, если среднее значение люминесценции не менее чем в 3 раза превышало среднее значение двух измерений оптической плотности отрицательного контроля.

Всего 61 образец был положителен к белку $S_{717–860}$, 56 образцов положительны к белку CoVN и 20 образцов были положительны к обоим белкам — $S_{717–860}$ и CoVN.

Далее из каждой группы отобрали 20 сывороток с наибольшими значениями сигнала и исследовали в ИФА против RBD.

Положительными к белку RBD оказались только две сыворотки, которые попали в выборку как положительные к белку $S_{717–860}$.

В выборке из 799 сывороток, собранных в разных субъектах РФ, были обнаружены кроссреактивные антитела, но уровни сигнала к RBD оказались чрезвычайно слабы, что, скорее всего, не способно предотвратить заражение SARS-CoV-2.

© О. Н. Шапрова, Е. А. Колосова, Д. В. Шаньшин, Д. Н. Щербаков, Т. Н. Ильичёва, 2021

* Работа выполнена при поддержке государственного задания (№ FZMW-(№ FZMW-2020-0007) и стипендии президента РФ (СП-5107.2021.4).

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ВИРУСНОГО СЛИЯНИЯ

Е. В. Шекунов, С. С. Ефимова, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E-mail: egor_shekunov@mail.ru

Аннотация

В ходе работы протестирована ингибирующая активность (ИА) растительных алкалоидов. Показано, что тестируемые агенты ингибируют кальций-опосредованное слияние отрицательно заряженных малых липидных везикул (МЛВ). Обнаружена корреляция между ИА алкалоидов и их способностью разупорядочивать мембранобразующие липиды. Дополнительно продемонстрирована эффективность ингибирующего действия алкалоидов при слиянии, запущенном фрагментами вирусных пептидов слияния MERS-CoV и SARS-CoV-2.

Пандемия COVID-19 продемонстрировала, что мировая система здравоохранения не готова к стремительному развитию новых вирусных штаммов. Существующие противовирусные лекарственные средства характеризуются ограниченной эффективностью применения. В связи с этим требуется разработка препаратов, обладающих широким спектром действия.

Одним из потенциальных методов лечения вирусных заболеваний может стать применение ингибиторов вирусного слияния (ИВС) с мембраноассоциированным механизмом действия. Молекулы ИВС способны модулировать физико-химические свойства липидного матрикса оболочки, окружающей вирион. Вследствие изменения молекулярных параметров бислоя, слияние между целевой клеткой и вирусом становится энергетически невыгодным, что нарушает жизненный цикл вириона. В настоящем исследовании на предмет проявления ИА при слиянии МЛВ протестировано 20 соединений алкалоидного ряда.

Методом измерения утечки флуоресцентного маркера, кальцеина, показано, что при кальций-индуцированном слиянии МЛВ, сформированных из смеси фосфохоглицерина и холестерина (ФГ/Хол) (80/20 мол.%), наибольшей ИА характеризуется пиперин, горденин, люпинин, 3-изобутил-л-метилксантин и таберсонин. При включении в липидную матрицу из ФГ и Хол фосфохолина (ФХ) (ФС/ФГ/Хол (40/40/20 мол.%)), выраженный ингибирующий эффект проявляют пиперин, люпинин и таберсонин. Полученные результаты подтверждаются методом динамического светорассеяния. Результаты измерения влияния алкалоидов на термотропное поведение липидов (изменение температуры основного фазового перехода, ΔT_m, и ширины пика на полувысоте, $\Delta T_{1/2}$) *и электрические свойства* ФГ/Хол мембран (*изменение граничного потенциала,* $\Delta\varphi_b$) представлено в таблице.

Параметры, характеризующие влияние алкалоидов на физические свойства ФГ/Хол мембран

Алкалоид	$-\Delta T_m$, C	$\Delta T_{1/2}$, °C	$\Delta\varphi_b$(max), mV
Колхицин	0	0	–24 ± 6
Котинин	0	0	–7 ± 3
1,7-диметилксантин	0	0	–5 ± 2
Капсаицин	2,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2	–70 ± 7
Синефрин	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	–25 ± 3
3-изобутил-л-метилксантин	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	–18 ± 4
Люпинин	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	–30 ± 3
Пиперин	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,2	–39 ± 8
Таберсонин	1,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2	58 ± 9
Горденин	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	8 ± 3

В случае применения в качестве фузогенного индуктора фрагментов вирусных пептидов слияния MERS-CoV и SARS-CoV-2, ИА продемонстрировал только пиперин.

Полученные результаты указывают на то, что ИА алкалоидов зависит от липидного состава мембраны и индуктора слияния. Выявлена корреляция между эффективностью действия алкалоидов на слияние МЛВ и кооперативностью фазового перехода липидов. Таким образом, вторичные метаболиты растений могут рассматриваться как потенциальные агенты для терапии COVID-19.

© Е. В. Шекунов, С. С. Ефимова, О. С. Остроумова, 2021

II

VIROME ANALYSIS OF SURFACE WATERS OF THE ARTIFICIAL RESERVOIR IN CENTRAL ASIA

M. S. Alexyuk, Y. S. Moldakhanov, K. S. Akanova, E. I. Anarkulova

LLC «Research and Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan

E-mail: Madina.a06@gmail.com

Abstract

Analysis of aquatic ecosystems showed that prokaryotic viruses are an integral part of the equilibrium ecological state of water bodies, representing one of the most numerous populations of aquatic ecosystems. The discovery and description of a unique group of bacterial and archaeal viruses has an impact on the field of prokaryotic virology, expanding our knowledge of viral diversity and changing the views of early stages of evolution.

Here, we present a metagenome analysis of the surface waters of the Aydarkul Lake. In this case, shotgun metagenomic sequencing DNA virus community was used.

Aydarkul is a large artificial drainage lake in the Arnasay system of lakes located in the northeastern part of Uzbekistan. This lake system is a key element of the Nuratau-Kyzylkum Biosphere Reserve. Located at the crossroads of the Afro-Eurasian migration routes, the Aydarkul-Arnasay lakes system is important place in migrating and wintering for waterfowl in the Central Asian region. In accordance with the Ramsar Convention on Wetlands of International Importance, since 1983 the Aydarkul has been included in the ornithological specially protected areas [1]. In consideration of exceptional ecological importance of this ecosystem, studying of the diversity of microbiome, phytoplankton zooplankton and virome of the lake is one of the most important tasks of environmental monitoring in the region. In our research, a metagenomic study of the viral diversity of the Aydarkul was carried out. The water sample after purification by membrane filtration was further concentrated by ultracentrifugation at a speed of 29,000 rpm for 120 min at 4 °C (Avanti J30I ultracentrifuge, Beckman Coulter). DNA was extracted using a Pure Link Genomic DNA minikit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. DNA libraries were prepared by the Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina, USA). Massive parallel sequencing was performed by using an Illumina MiSeq instrument (paired-end sequencing, 2 x 300 bp; MiSeq kit v3). After the removal of low-quality reads and adapter trimming reads were analyzed by the Kaiju program using the nonredundant protein database of bacteria, archaea, viruses, fungi, and microbial eukaryotes with default parameters as a reference. Taxonomic classification of metagenomic data of the Aydarkul showed that 74 % of the sequences corresponded to bacteria, 16 % to lower eukaryotes, 1 % to *Archaea*, 4 % to viruses, and 5 % to unclassified organisms. Among the viral sequences, the group of viruses with double-stranded DNA genome was the most common group in the investigated sample. A smaller percentage of sequences among the obtained metagenomic data sets related to ssDNA viruses and amounted to 0.6 % of the number of viral reads. Among the viral sequences affiliated with dsDNA, the majority belonged to tailed bacteriophages of the *Caudovirales* order (73 %), consisting of the *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae* families, 5 % of the sequences were classified and assigned to the *Phycodnaviridae* family, and the sequences of the *Herpesviridae* family made 3 %. The number of mimiviruses did not exceed 0.9 %. In general, an analysis of annotated sequences revealed 21 dsDNA families of viruses that infect bacteria, algae, birds, fish, insects, humans, etc.

This study is the first report on the viral diversity of the Aydarkul based on a metagenomic analysis, which expands our knowledge of the microflora of the Aral–Syr Darya water basin.

© M. S. Alexyuk, Y. S. Moldakhanov, K. S. Akanova, E. I. Anarkulova, 2021

НАНОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕТА-АМЛОИДОВ ПРИ БОЛЕЗНИ КРЕЙТЦФЕЛЬДАТА — ЯКОБА

А. Н. Асташонок, Н. Н. Полещук

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

E-mail: micro.87@mail.ru

Аннотация

Прионные заболевания (ПЗ) рассматриваются как особый класс болезней человека и животных, связанных с избыточным накоплением в ткани ЦНС агрегатов β-складчатого прионного белка PrP_{Sc} или $PrP_{27–30}$, устойчивого к протеолитическому расщеплению. Учитывая, что инфекционный прион вариабелен по молекулярному весу (6,5, 12, 17–21, 27–30 кДа) при деградации различными концентрациями протеиназы К и индикации продуктов распада в геле актуальным является выделение и идентификация из ткани ЦНС различных белковых структур, формируемых PrP.

Цель работы

Смоделировать инфекционный процесс на лабораторных животных с использованием возбудителя болезни Крейтцфельдта — Якоба (БКЯ), выделить из ткани ЦНС прионные амилоиды и дать их характеристику.

Материалы и методы

Использовали нативные инфекционные образцы мозговой ткани 3 пациентов, умерших от БКЯ, полученных за период 2011–2020 гг. Для воспроизведения БКЯ инфекции были взяты лабораторные мыши инбредной линии СВА. Опытных животных (n = 15) инфицировали в левое полушарие головного мозга концентрированным гомогенатом мозговой ткани (0,03 мл), контрольным (n = 5) — вводили плацебо (0,1М фосфатно-солевой буфер). Экстракцию прионного белка PrP^d проводили путем гомогенизации мозговой ткани, фенол / хлороформной экстракции, суспендировании в 1 % додецилсульфате натрия. На заключительной стадии белок выделяли путем преципитации в изопропиловом спирте. Далее разделяли на отдельные аликвоты и хранили при –20 °С до использования.

В работе использовали тейпинговые микрозонды (константа жесткости — 3 Н/м, резонансная частота — 60 кГц, радиус — <10 нм). Топографические изображения различных патологических белковых структур, нанесенных на гидрофильную слюдяную поверхность, получали на микроскопе Nanoscope IIId MultiMode (Bruker, США).

Результаты

Наиболее многочисленным типом белковых наноразмерных элементов были структуры в виде прионных палочек и глобул. Палочки представляли собой стержнеподобные структуры длиной (l) 100–200 нм, шириной 20 нм и высотой 4–5 нм. Прионные палочки характеризовались неоднородными участками рельефа (Ra — 0,87±0,05 нм, Rq — 1,12±0,09 нм, коэффициент ассиметрии — 0,84) с разницей перепадов высот между пиками и впадинами — 1,12–8,74 нм. Эти данные указывали о различной степени упорядоченности белковых кластеров в составе палочек. При этом центральная часть (кор), как правило, не имела резких перепадов шероховатости по сравнению с периферийными участками. Вторым типом белковых структур были глобулы. Они характеризовались разрозненными или сцепленными в виде цепочек сферами диаметром 10–25 нм, которые на сканах имели как как светлые, так и темные очертания. Это указывает о различиях в высоте этих частиц и их плотности. Все эти факты могут быть дополнительным свидетельством, что прионные фибриллы собираются из иерархически более мелких частиц, существующих в различных структурно-пространственных изоформах.

Таким образом, выявление в образцах гетерогенных по наногеометрии белковых субструктур прионов может указывать о наличии различных клинико-патологических фенотипов прионных заболеваний, определяющих степени выраженности и тяжести течения заболевания.

© А. Н. Асташонок, Н. Н. Полещук, 2021

СИНТЕЗ И АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ 24-ПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭПИТОПЫ НЕСТРУКТУРНОГО АНТИГЕНА NS4A ВИРУСА ГЕПАТИТА С

А. Н. Белявцев[1,2], Н. С. Шастина[1], Е. Ф. Колесанова[3], М. В. Мельникова[3], Р. Г. Вахренев[3], Н. Г. Шевченко[2], Г. В. Сапронов[2], Л. И. Николаева[2]

[1]МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[2]Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва
[3]НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва

E-mail: sance88@mail.ru

Аннотация

Твердофазным методом синтеза получен полноценный 24-членный пептидный иммуноген, содержащий В-клеточный и Т-хелперный эпитопы из средней области антигена NS4A ВГС. Произведена оценка его иммунореактивности методом ИФА относительно белка ВГС, продуцируемого в печени инфицированных пациентов, для предварительного подтверждения антигенной активности. Иммуногенность пептида подтверждена наличием специфических антител у лабораторных мышей после иммунизации.

При создании синтетических пептидных вакцин, направленных против вируса гепатита С (ВГС), важно выбрать фрагменты наиболее консервативных участков вирусного белка, содержащие как В-клеточный, так и Т-хелперные эпитопы, для включения их в систему презентации иммунокомпетентным клеткам [1]. В качестве источника синтетического иммуногена для иммуногенной композиции на основе липосом нами был выбран полипептид NS4A ВГС, являющийся кофактором протеазы NS3 ВГС.

Целью настоящей работы является синтез и анализ иммуногенности 24-пептида — синтетического фрагмента полипептида NS4A ВГС, содержащего В- и Т-хелперные эпитопы, для последующего применения этого иммуногена в разработке липосомальной формы кандидатной вакцины против ВГС.

В качестве потенциального пептидного иммуногена был выбран фрагмент 24–47 антигена NS4A ВГС (генотип 1b) с одной несинонимичной заменой аминокислотного остатка на С-конце пептида, содержащий Т-хелперный эпитопный мотив, подтвержденный экспериментально [2], и имеющий достаточно гидрофильный С-концевой участок, который предположительно будет доступен для взаимодействия с антителами и рецепторами В-клеток в составе липосом. Амидированный по С-концу 24-пептид VIVGRIILSGRPAVIPDREVLYRK, соответствующий указанному участку, был получен твердофазным синтезом по Fmoc-протоколу на смоле Ринка методом *in situ* активированных эфиров [3]. Пептид очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), чистоту препарата контролировали ВЭЖХ с УФ- и масс-спектрометрической детекцией (чистота пептида выше 95 %).

Иммуноферментным анализом (ИФА) была проверена иммунореактивность пептида на сыворотках крови от 84 человек, инфицированных ВГС и содержащих по результатам ИФА в тест-системе «Бест-анти-ВГС-спектр» суммарные антитела к антигенам NS4A и NS4B и 10 здоровых людей. В 41,7 % сывороток от инфицированных людей были выявлены антитела к 24-пептиду, сорбированному в полистирольных планшетах в количестве 1 мкг на лунку. Все 10 образцов от здоровых людей не взаимодействовали с пептидом. В позитивных образцах от инфицированных людей превышение оптической плотности относительно образцов от здоровых людей было более чем в 3 раза. Иммунизация лабораторных мышей пептидом привела к выработке специфических антител. Тем самым подтверждена иммуногенность выбранного нами фрагмента NS4 и перспективность его использования в качестве конъюгированного с адъювантом или включенного в липосомы иммуногена для кандидатной вакцины против ВГС.

Литература

1. Baz A., Buttigieg K., Zeng W. et al. // Vaccine. 2008. No 26, P. 2570–2579; URL: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.022

2. Gerlach J. T., Ulsenheimer A., Grüner N. H. et al. // J. of Virology. 2005. No 19. 12425–12433; doi:10.1128/JVI.79.19.12425–12433.2005.

3. Kolesanova E. F., Sanzhakov M. A., Kharybin O. N. // J. of Peptides. 2013. Article ID 197317, 9 p. http://dx.doi.org/10.1155/2013/197317

© А. Н. Белявцев, Н. С. Шастина, Е. Ф. Колесанова, М. В. Мельникова, Р. Г. Вахренев, Н. Г. Шевченко, Г. В. Сапронов, Л. И. Николаева, 2021

DETECTING VIRAL READS IN BAT METAGENOMIC SEQUENCING DATA WITH VIRIDAL BIOINFORMATIC PIPELINE

A. Y. Budkina[1,2], E. V. Korneenko[1], I. A. Kotov[1,2], K. F. Khafizov[1,2], V. G. Akimkin[1]

[1] *Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

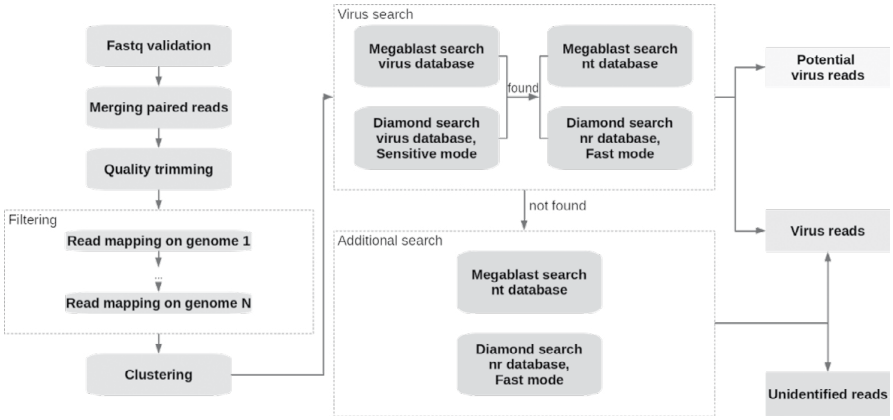
E-mail: anna.y.budkina@gmail.com

Abstract

The usage of high-throughput sequencing methods potentially makes it possible to effectively investigate the variety of viruses in the biological samples under study. To search for viral reads in the data obtained, we developed the VirIdAl software pipeline. The pipeline was applied to the metagenomic data, obtained from the feces of bats inhabiting the Moscow region. The results demonstrated the viral variety of the studied metagenomes. Notably, sequences belonging to the MERS-like betacoronavirus were found in several samples.

High-throughput sequencing technologies are becoming increasingly important in virus detection. In particular, metagenomic sequencing approaches potentially allow the identification of all viral sequences presented in a sample. The software used for this purpose has to take into account a number of peculiarities of metagenomic data, such as low viral nucleic acid concentrations in a sample, the presence of microbial and host sequences, as well as the heterogeneity of viral genomes. The latter significantly limits research methods based on comparisons of the found sequences with those available in genomic databases.

We present the VirIdAl bioinformatic pipeline for the virus reads identification and classification in NGS data. The algorithm of the pipeline includes quality trimming, filtering out sequences belonging to the host, clustering, and searching for viral sequences. The last-mentioned step consists of 2 stages: (1) alignment to the reference viral genomes with high sensitivity, (2) search with high specificity in the nr/nt (or user prepared) databases. Alignments are carried out both at the level of nucleotide sequences using megablast tool and with the amino acid sequences using Diamond.



The principal scheme of the VirIdAl bioinformatics pipeline

The pipeline was applied to metagenomic data derived from 13 bat feces samples collected in 2015 in the Moscow region. Numerous viruses were identified that were related to bats, insects, plants, and protozoa. The majority of samples had sequences of bat alphacoronaviruses, and four samples contained sequences of a MERS-like betacoronavirus.

DeePaC-vir LSTM model was applied to the reads that were not assigned to any taxon. The sequences with high virus classification scores were translated into the amino acids and compared against the Pfam profile-HMM database using hmmscan search. Several virus proteins related to bats have been identified, such as *Coronavirus*, *Mamastrovirus*, *Adenovirus*, *Parvovirus* and others, as well as viruses, hosted by other organisms.

Due to the two-stage search, the pipeline allows for the reduction of the number of false positives while increasing the speed of data processing. We demonstrated that standard alignment approaches are insufficient for identifying all viral sequences present in a sample. Machine learning techniques, as well as methods based on hidden Markov models, enable the identification of sequences that possess very distant homology with the reference genomes, which is undetectable by traditional alignment-based tools.

© A. Y. Budkina, E. V. Korneenko, I. A. Kotov, K. Khafizov, V. G. Akimkin, 2021

АНАЛИЗ ЛЕНТОГЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА У ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ*

А. А. Дёрко[1], Н. А. Дубовицкий[1], Е. П. Манеева[2], Т. А. Мурашкина[1], А. В. Глущенко[1], Е. В. Шемякин[3], М. А. Хаснатинов[4], А. М. Шестопалов[1], К. А. Шаршов[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный педагогический университет*
[3] *Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск*
[4] *Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск*

E-mail: a.derko19@gmail.com

Аннотация

В рамках ежегодного мониторинга вируса гриппа А среди диких водоплавающих птиц азиатской части России с 2013 по 2018 гг. были получены 23 полногеномные последовательности вируса болезни Ньюкасла. В результате филогенетического анализа было установлено, что 13 из них относятся к субгенотипу 1.2 (ранее 1c и 1d) класса I. Еще 10 последовательностей принадлежат к генотипу I класса II. Аминокислотная последовательность сайта расщепления белка F всех полученных штаммов была характерна для лентогенных штаммов (с низкой патогенностью).

Лентогенные штаммы вируса болезни Ньюкасла (ВБН) реплицируются в клетках организма-хозяина, но не вызывают заболевания [1]. Отсутствие симптомов и невыраженное влияние на птицеводство делают неактуальной диагностику у клинически здоровых домашних птиц. Большая часть информации о случаях выделения ВБН с низкой патогенностью носит сопутствующий характер и чаще всего связана с мониторингом вируса гриппа А в популяциях диких мигрирующих птиц. Однако наблюдение за лентогенными штаммами необходимо для определения их патогенного потенциала, понимания глобальной картины циркуляции вируса болезни Ньюкасла и разработки стратегии вакцинации.

Клоакальные мазки диких водоплавающих птиц были собраны в период с 2013 по 2018 гг. в рамках ежегодного мониторинга вируса гриппа А. Сбор осуществляли на территории 7 регионов России: в Новосибирской области, Республиках Тыва, Бурятия, Якутия и Дагестан, в Амурской области и Камчатском крае. Также в 2014 г. пробы были собраны в Павлодарской области Казахстана. После культивирования проб на развивающихся куриных эмбрионах [1], полученную аллантоисную жидкость проверяли на наличие РНК вируса гриппа А методом ПЦР «в режиме реального времени». **З**атем, пробы, в которых не была обнаружена искомая РНК, проверяли на наличие вирусов семейства *Paramyxoviridae* по описанной методике [2]. После чего устанавливали полногеномные последовательности вирусов методом секвенирования нового поколения на платформе MiSeq (Illumina, США). Филогенетический анализ последовательностей проводили при помощи ПО MEGA X [3].

В результате были получены 23 полногеномные последовательности вируса болезни Ньюкасла. Все последовательности были опубликованы в базе данных GenBank [4]. Наибольшее количество штаммов (18 из 23) было получено от представителей рода речных уток (*Anas)* семейства утиные (*Anatidae*).

Филогенетический анализ гена F показал, что 13 штаммов, полученных в ходе исследования, принадлежат к генетической группе класса I, представленной в основном лентогенными штаммами диких птиц. Все они относятся к субгенотипу 1.2 генотипа 1 (классификация по Dimitrov с соавт. [5]).

Еще 10 штаммов принадлежат к классу II. Девять из них относятся к субгенотипу I.2 генотипа I. Близкородственными оказались штаммы из Нигерии и России, которые были выявлены у обыкновенного шпорцевого гуся (*Plectropterus gambensis*) в 2008 г. и утки в 2001 г., соответственно. Примечательно, что штамм NDV/little gull/Uvs-Nuur Lake/Russia/14A/2014, выделенный от чайки малой (*Larus minutus*), принадлежит к субгенотипу I.1.2.1 и является филогенетически близким со штаммом, полученным в Швеции от чайки озерной (*Chroicocephalus ridibundus*) в 1994 г.

По результатам анализа аминокислотных замен сайт расщепления белка F у всех полученных штаммов имеет вид E/G-**R**/**K**-Q-E/G/-**R**↓L и содержит два остатка аргинина или лизина, что характерно для штаммов ВБН с низкой патогенностью.

© А. А. Дёрко, Н. А. Дубовицкий, Е. П. Манеева, Т. А. Мурашкина, А. В. Глущенко, Е. В. Шемякин, М. А. Хаснатинов, А. М. Шестопалов, К. А. Шаршов, 2021

* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 20-44-07001.

Литература

1. McGinnes L. W. et al. Newcastle disease virus: propagation, quantification, and storage // Curr Protoc Microbiol. 2006. Vol. 1. P. 15F.2.1–15F.2.18.

2. Van Boheemen S. et al. A family-wide rt-pcr assay for detection of paramyxoviruses and application to a large-scale surveillance study // PLoS ONE. 2012. Vol. 7. No 4.

3. Kumar S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Molecular Biology and Evolution. Oxford University Press, 2018. Vol. 35. No 6. P. 1547–1549.

4. Home — Nucleotide — NCBI [Electronic resource]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/ (accessed: 02.08.2021).

5. Dimitrov K. M. et al. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus // Infection, Genetics and Evolution. 2019. Vol. 74.

АНАЛИЗ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ НА ТЕРРИТОРИИ КИРГИЗИИ*

В. Е. Екушов[1], М. В. Сивай[1], А. В. Тотменин[1], В. В. Ивлев[1], И. П. Осипова[1], Д. П. Зырянова[1], Т. М. Налимова[1], М. П. Гашникова[1], У. З. Чокмоморова[2], У. Т. Моторов[3], Ж. К. Акматова[2], Н. А. Асыбалиева[2], Э. Б. Нарматова[3], А. А. Бекболотов[2], У. К. Кадырбеков[2], Р. А. Максютов[1], Н. М. Гашникова[1]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, р. п. Кольцово*
[2]*Республиканский центр СПИД, Бишкек, Киргизия*
[3]*Ошский областной центр профилактики и борьбы со СПИДом, Ош, Киргизия*

E-mail: ekushov_ve@vector.nsc.ru

Аннотация

Один из самых высоких показателей новых случаев инфицирования ВИЧ-1 в Центральной Азии приходится на Киргизию. В 2020 г. на территории страны проживало в среднем 9200 (8400–9900) ВИЧ-положительных. Эпидемия ВИЧ-1 концентрируется в ключевых группах населения, в основном среди лиц, употребляющих инъекционные наркотики (ЛУИН), и их половых партнеров.

В 2021 г. при сотрудничестве с центром СПИД Киргизии было собрано и проанализировано 75 клинических образцов периферической крови ВИЧ-инфицированных жителей, принимающих антиретровирусные препараты (АРП). Для данных образцов получены фрагменты гена *pol* кодирующего протеазу и обратную транскриптазу.

Филогенетический анализ выбранного фрагмента показал следующее распределение циркулирующих вариантов ВИЧ-1 в выборке: CRF02_AG — 44 %, A6 — 48 %, CRF63_02A — 5,3 %, CRF03_AB и B/G — 1,3 %.

В результате анализа данных за 2021 г. в 25,3 % случаев были выявлены мутации ассоциированные со снижением чувствительности вируса к антиретровирусным препаратам. Мутации устойчивости к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (NRTI) встречаются в 9 % случаев, к ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (NNRTI) в 16 %, при этом у 8 % пациентов резистентность развивалась к двум классам препаратов (NRTI и NNRTI). Мутации к ингибиторам протеаз (PI) были обнаружены в 3 % случаев.

Согласно данным, опубликованным за 2016–2019 гг., мутации устойчивости к АРП были обнаружены у 26,9 % пациентов. Мутации устойчивости к NRTI были обнаружены у 72 % пациентов, мутации устойчивости к NNRTI — у 93 % пациентов, а у 3 % пациентов были обнаружены мутации устойчивости к IP. Мутации лекарственной устойчивости как минимум к двум классам препаратов были обнаружены у 62,2 % пациентов, 97 из них имели мутации устойчивости к NRTI и NNRTI.

Наиболее часто встречающимися мутациями устойчивости к NRTI были: M184V/I 64 % в 2016–2019 гг. и 46,7 % в 2021 г., T215F/Y 26,7 % в 2016–2019 гг. и 13,3 % в 2021 г., M41L 14,7 % в 2016–2019 гг., 6,7 % в 2021 г., K219Q 14 % в 2016–2019 гг. и 6,7 % в 2021 г. Наиболее распространенными мутациями устойчивости к NNRTI были мутации: K103N 60,7 % в 2016–2019 гг., 53,3 % в 2021 г., Y181C 18 % в 2016–2019 гг., 20,0 % в 2021 г., G190A/S 18 % в 2016–2019 гг. и 13,3 % в 2021 г. Мутации устойчивости к основным PI в 2016–2019 гг. были распространены: M46I/L 3,2 %, I54V 1,3 %, V82A 1,3 % и L76V 0,7 %, в 2021 г. детектировалась лишь одна мутация M46I 13,3 %.

Проведенное за 2021 г. исследование, показало низкую частоту регистрации ВИЧ-1, несущих мутации, ассоциированные с резистентностью к антиретровирусным препаратам по сравнению с предыдущими годами. Сравнительный анализ частоты встречаемости за исследуемый период показал снижения распространенности мутаций резистентности ВИЧ-1 к АРП, что указывает на увеличение эффективность проводимых мероприятий по контролю приверженности к антиретровирусной терапии.

© В. Е. Екушов, М. В. Сивай, А. В. Тотменин, В. В. Ивлев, И. П. Осипова, Д. П. Зырянова, Т. М. Налимова, М. П. Гашникова, У. З. Чокмоморова, У. Т. Моторов, Ж. К. Акматова, Н. А. Асыбалиева, Э. Б. Нарматова, А. А. Бекболотов, У. К. Кадырбеков, Р. А. Максютов, Н. М. Гашникова, 2021

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ШТАММОВ ВИРУСА SARS-COV-2

А. С. Есьман, С. А. Саламайкина, А. С. Сперанская, А. С. Черкашина, К. О. Миронов

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора

E-mail: esman@cmd.su

Аннотация

Изменения в структуре генома вируса SARS-Cov-2 приводят к возникновению вариантов, которые отличаются от дикоө го типа вирулентными свойствами. ВОЗ обозначила данные варианты как вызывающие интерес (VOIs, Variants of Interest) и вызывающие озабоченность (VOCs, Variants of Concern) [1]. На особенности терапии и иммунопрофилактики заболеваний, вызванных теми или иными штаммами, влияет изменение генетических свойств вируса. В связи с этим определение мутаций в геноме вируса SARS-Cov-2 и их классификация на VOIs и VOCs является важным элементом молекулярно-генетического мониторинга штаммов новой коронавирусной инфекции [2].

Определение мутаций проводится с использованием широкого спектра молекулярно-биологических методов, из которых наибольшее практическое применение получили: ПЦР в режиме реального времени и методы секвенирования. Подходы, основанные на секвенировании по Сэнгеру, пиросеквенирование и массовое параллельное секвенирование с использованием различных платформ используются чаще всего. Наиболее простым и быстрым способом определения известных нуклеотидных замен является метод пиросеквенирования, с использованием реагентов и оборудования фирмы «Qiagen» (Германия), широко применяемый для определения однонуклеотидных полиморфизмов [3]. При помощи этого подхода разработаны методики для определения эпидемически значимых вариантов штаммов вируса SARS-CoV-2: альфа («британский», B.1.1.7), бета («южноафриканский», B.1.351), гамма («бразильский», P.1), дельта («индийский», B.1.617.2), («московский», B.1.1.451). Для идентификации вариантов используются методики обнаружения мутаций del HIV69-70, del Y144, N501Y, A570D, E484K G>A, D80A A>C, D138Y G>T, L452R T>G, P681R, S494P T>C, FR157-158del, F306L T>C, E484Q G>C в различных сочетаниях, при этом возможно выявление новых генетических вариантов вируса SARS-CoV-2.

В основе перечисленных методик — 45 циклов амплификации короткого фрагмента кДНК вируса (не более 120 пар оснований), что имеет значение при тестировании образцов, содержащих небольшие количества вирусной РНК. Разработанный подход является основой для верификации разрабатываемых альтернативных, основанных на ПЦР в режиме реального времени методик, а также для определения мутаций в биологических образцах, отрицательных при проведении типирования с использованием других методов секвенирования. Разработка альтернативных чувствительных подходов, основанных на пиросеквенировании, позволяет решать проблему дифференцировки истинных однонуклеотидных вариантов (SNV) от ошибок полногеномного и фрагментного секвенирования или артефактов пробоподготовки [4].

Литература

1. URL: https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/ (дата обращения 25.08.2021).

2. Приказ Роспотребнадзора № 56 от 19.02.2021 «О совершенствовании молекулярно-генетического мониторинга штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции».

3. Миронов К. О., Дунаева Д. А., Дрибноходова О. П., Шипулин Г. А. Определение нуклеотидных полиморфизмов с помощью систем генетического анализа, основанных на пиросеквенировании // Лабораторная медицина. 2013. № 12. С. 75–79.

4. Сперанская А. С., Каптелова В. В., Самойлов А. Е. и др. Генетическая вариабельность SARS-CoV-2 в биологических образцах от пациентов г. Москвы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97. № 6. С. 511–517. URL: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-1.

© А. С. Есьман, С. А. Саламайкина, А. С. Сперанская, А. С. Черкашина, К. О. Миронов, 2021

EFFICIENT MONITORING OF THE SPREAD OF SARS-COV-2 VARIANTS BY TARGETED HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING

V. V. Kaptelova[1], I. A. Kotov[1,2], N. I. Borisova[1], A. A. Kolesnikov[1], D. A. Marakulina[1], A. Y. Budkina[1], K. F. Khafizov[1], V. G. Akimkin[1]

[1] Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow
[2] Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

E-mail: valeriia.kaptelova@gmail.com

Abstract

In this work, we describe an inexpensive high-throughput method for sequencing the whole S protein gene of SARS-CoV-2. The presented methodology helps to significantly reduce time, as well as material and labor costs, which makes it particularly suitable for epidemiological surveillance and monitoring of various variants of SARS-CoV-2.

The outbreak of a new coronavirus was first reported in Wuhan at the end of December 2019. Subsequently, the virus was called Severe Acute Respiratory Syndrome CoV 2 (SARS-CoV-2). A new pathogen has actively spread around the world and today there are about 220 million confirmed cases and over 4,5 million deaths. Despite the numerous measures to contain the spread, the number of new cases is still growing, including reinfection cases.

Since the end of 2020, some variants of concern have been found around the world, including strains «alpha» (B.1.1.7), «beta» (B.1.351), «gamma» (P.1), and «delta» (B.1.617.2). The scientists were interested in the new variants after the rising of the contagion rate of human-to-human transmission in several regions of the world. Subsequently, these new strains of the pathogen were identified in many countries. In particular, the «delta» variant of the SARS-CoV-2 is the most contagious and it became dominant in many countries. The results of our research showed that up to 100 % of samples tested, obtained from patients with PCR-confirmed COVID-19 diagnosis, contained «delta» variants.

The use of existing methods for searching for mutations is not always effective and cannot be fully implemented in a number of cases. The whole-genome sequencing certainly allows studying the genomes in full detail, but it is an expensive and time-consuming method. This fact can be an issue for using this technique for processing a large number of samples, especially when time and funding resources are limited.

On the other hand, the PCR method is highly effective for diagnostics, and can also be used to identify well-known mutations for determining the pathogen strain contained in the sample. However, the virus is known to have a high mutation rate and new changes in the genome require regular updating of the PCR kits. Generally, most of the significant mutations having an impact on the spreading rate of the virus are localized in the spike- or S-gene of SARS-CoV-2. These include L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y, A570D, P681H, etc. In a previous study, we described the primer panel to amplify fragments of the most significant («hot-spot») regions of the SARS-CoV-2 S-protein gene. It allowed us to quickly identify the virus strain [1].

Here we describe an inexpensive high-throughput method for sequencing the whole spike protein gene of SARS-CoV-2 for monitoring the spread of known strains as well as to detect new mutations. The new primer panel allows to skip a lot of expensive steps of sample preparation such as ligation, which contributes to quick and cost-effective obtaining of information about genome sequence. We analyzed over a thousand coronavirus isolates using this panel, and the obtained sequences have been deposited in the VGARus database. The presented methodology helps to significantly reduce time, as well as material and labor costs, which makes it particularly suitable for epidemiological surveillance and monitoring of various variants of SARS-CoV-2. Furthermore, a similar approach also can be used for the research of other viruses.

References

1. *Borisova* N. I. *et al.* 2021. Monitoring the spread of SARS-CoV-2 variants in Moscow and the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. bioRxiv 2021.07.15.452488; doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.15.452488.

© V. V. Kaptelova, I. A. Kotov, N. I. Borisova, A. A. Kolesnikov, D. A. Marakulina, A. Y. Budkina, K. Khafizov, V. G. Akimkin, 2021

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ МЫШЕЙ И ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ СКРИНИНГОВОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ*

Ю. В. Коняхина, К. А. Титова, А. А. Сергеев, С. Н. Щелкунов

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

E-mail:iuliakonyahina@yandex.ru

Аннотация

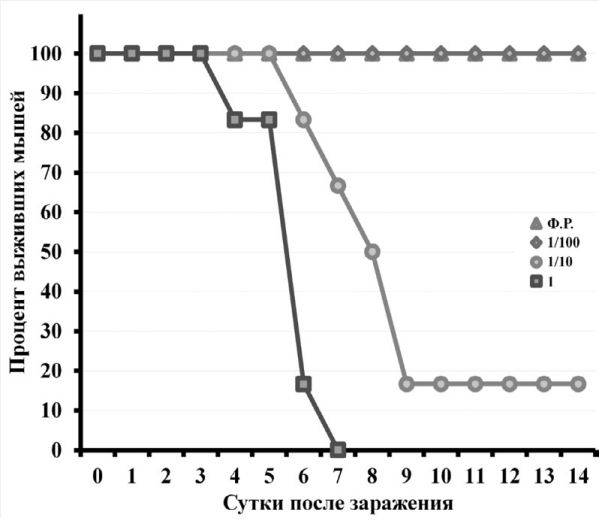
В исследовании представлены данные определения $ЛД_{50}$ при интраназальном инфицировании мышей линии BALB/c штаммом НВ-92 вируса осповакцины. В результате заражения отмечались заболевание и гибель животных. $ЛД_{50}$ составила 4,8 lg БОЕ/мышь. Полученные результаты позволяют продолжить разработку модельной биосистемы на основе штамма НВ-92 вируса осповакцины при инфицировании мышей линии BALB/c. Данная модель сможет применяться для скрининговой оценки эффективности противовирусных препаратов и вакцин.

Для оценки эффективности разрабатываемых противовирусных препаратов и вакцин против ортопоксвирусных инфекций существует множество модельных биосистем, но у каждой модели есть свои особенности. Существуют модельные биосистемы на основе высокопатогенного для человека вируса оспы обезьян, а также низкопатогенных или непатогенных для людей вирусов оспы коров, осповакцины (ВОВ), эктромелии. По требованиям Всемирной организации здравоохранения работу с патогенным для человека микроорганизмом необходимо проводить в изолированной лаборатории с уровнем биологической безопасности, соответствующим его патогенности. В этом плане из всех представителей ортопоксвирусов наиболее оптимально для первичного скрининга использовать модель на основе ВОВ и мышей, так как он не относится к патогенам человека (в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами — СП1.3.3118-13), а модели с использованием мышей являются наиболее дешевыми и простыми в применении. В связи с этим разработка модели на основе штамма ВОВ, вызывающего заболевание и гибель у мышей является необходимой.

Цель данной работы состояла в определении чувствительности (по показателю 50%-й летальной дозы — $ЛД_{50}$) 9–10-недельных мышей линии BALB/c при интраназальном инфицировании штаммом НВ-92 ВОВ. Штамм НВ-92 ВОВ выделен из ткани головного мозга кролика породы Шиншилла, инфицированного интрацеребрально вирусом ВОВ ЛИВП. Данный патоген был получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Полученный штамм НВ-92 ВОВ был наработан в монослое культуры клеток Vero в концентрации 7,5 lg БОЕ/мл.

Мышей заражали интраназально 50 мкл вирусной суспензии последовательными 10-кратными разведениями исходного препарата, начиная с дозы 6,2 lg БОЕ/мышь. В группе заражения максимальной дозой этого вируса у всех животных отмечались клинические проявления заболевания (взъерошенность шерсти, конъюнктивит, блефарит, сутулая поза, адинамия, тремор) с последующей их гибелью (см. рисунок). В группе заражения 10-кратным разведением исходного вируса также отмечались признаки заболевания, но погибло 5 из 6 животных. В группе заражения 100-кратным разведением вируса выжили все животные. $ЛД_{50}$ составила 4,8 lg БОЕ/мышь.

В дальнейшем планируются эксперименты по адаптации данного штамма ВОВ к мышам BALB/c с целью получения более вирулентного штамма ВОВ для создания модели, позволяющей проводить оценку эффективности противовирусных препаратов и вакцин при заражении животных более высокими дозами (100–1000 $ЛД_{50}$) вируса.



Данные по чувствительности 9–10-недельных мышей BALB/c к штамму НВ-92 ВОВ. Приведены данные для трех групп из 6 животных, интраназально зараженных соответствующим вирусом, а также для группы мышей, интраназально обработанных физиологическим раствором — Ф.Р. (отрицательный контроль)

© Ю. В. Коняхина, К. А. Титова, А. А. Сергеев, С. Н. Щелкунов, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОГО ГЕНОМА НОВОГО MERS-COV-ПОДОБНОГО БЕТАКОРОНАВИРУСА ИЗ ПОМЕТА PIPPISTRELLUS NATHUSII ИЗ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Е. В. Корнеенко[1], А. Е. Самойлов[1], И. В. Артюшин[2],
В. Г. Дедков[3], Ю. С. Смирнова[1], М. И. Надтока[1], А. С. Сперанская[1]

[1] ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва
[2] Московский государственный университет, Москва
[3] Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

E-mail: lennatta@yandex.ru

Аннотация

Рукокрылые являются природным резервуаром многих вирусов, включая коронавирусы. В связи с распространением таких заболеваний как тяжелый острый респираторный синдром, ближневосточный респираторный синдром, COVID-19, вызванных коронавирусами, мониторинг вирусной популяции в летучих мышах представляет большой интерес. В нашем исследовании мы обнаружили полный геном MERS-CoV-подобного вируса методом полногеномного секвенирования в образце фекалий от летучей мыши рода *Pippistrellus nathusii*.

Рукокрылые — единственный отряд млекопитающих, способный к полету. Известно, что рукокрылые являются природным резервуаром многих вирусов, включая коронавирусы. За последние несколько десятилетий коронавирусы стали причиной тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-cov), ближневосточного респираторного синдрома (MERS-cov), Covid-19 (SARS-cov-2). По этой причине мониторинг вирусной популяции в летучих мышах представляет большой интерес. В данном исследование мы провели полногеномное секвенирование и метагеномный анализ образцов фекалий от летучих мышей родов *Pippistrellus nathusii, Nyctalus noctula, Myotis brandtii, Myotis daubentonii*, которые были собраны в 2015 г. в Звенигородской регионе Московской области. Для 13 образцов фекалий была проведена экстракция РНК набором QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), обратная транскрипция с использованием набора Reverta-L (АмплиСенс), подготовку библиотек осуществляли с использованием набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB), с последующим секвенированием на платформе Hiseq 1500 (Illumina), а также NextSeq 2000 (Illumina). Анализ сырых данных проведен с использованием программ FastQC, trimmomatic 0.38, сборка осуществлялась с помощью SPAdes 3.15, таксономическая принадлежность определялась с помощью blastn. В результате проведенного секвенирования на платформах Hiseq 1500, дополнительного секвенирования на NextSeq 2000 и метагеномного анализа в одном из образцов обнаружен полный геном бетакоронавируса (30260 п.н.), который на 80 % идентичен полному геному Middle East respiratory syndrome-related coronavirus isolate Bat-CoV/H.savii/Italy/206645-40/2011 по результатам blastn (GenBank: MG596802). Данный образец фекалий получен от летучей мыши рода *Pippistrellus nathusii (Лесной нетопырь)*. Учитывая тот факт, что некоторые рода летучих мышей являются мигрирующими (включая род *Pippistrellus nathusii*), наши данные вносят вклад в изучение распространения коронавирусов среди рукокрылых, а также возможной межвидовой передачи вирусов от летучих мышей животным и человеку.

© Е. В. Корнеенко, А. Е. Самойлов, И. В. Артюшин, В. Г. Дедков, Ю. С. Смирнова, М. И. Надтока, А. С. Сперанская, 2021

ВАКЦИННАЯ КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА MVA ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСА ЭБОЛА

А. В. Семенова, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева, С. А. Пьянков, И. С. Шульгина, Г. В. Кочнева

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

E-mail: tkacheva_av@mail.ru

Аннотация

На основе аттенуированного штамма MVA вируса осповакцины сконструирована иммуногенная вакцинная конструкция MVA-GP-VP40-|EBOV, экспрессирующая вирусоподобные частицы, имитирующие природную инфекцию вирусом Эбола.

Перспективную вакцинную платформу в отношении особо опасных филовирусных инфекций представляет собой комбинация из двух подходов — использование безопасного вирусного вектора и непатогенных вирусоподобных частиц (ВПЧ), имитирующих вирионы особо опасных патогенов.

Штамм MVA вируса осповакцины (VACV) — высокоперспективный безопасный вирусный вектор для вакцин, поскольку он является репликативно-дефектным штаммом для клеток человека, а также рекомбинантные штаммы MVA обладают высокой иммуногенностью и хорошими защитными свойствами, что было подтверждено в различных доклинических моделях.

В качестве трансгена для продукции ВПЧ вируса Эбола (EBOV) необходимо использовать кассету из нескольких генов структурных белков этого вируса. Поверхностный гликопротеин GP отвечает за прикрепление и проникновение вируса в клетки и играет важную роль в индукции связывающих и нейтрализующих антител против EBOV. Матричный белок VP40 играет ключевую роль в сборке и почковании вируса и способен направлять почкование вирусоподобных частиц из клеток млекопитающих в отсутствии или в присутствии других белков вируса. Например, было описано, что совместная экспрессия белков VP40 и GP приводит к высвобождению ВПЧ EBOV, которые, как было показано, обеспечивают эффективную защиту от летальной инфекции вируса Эбола на животных моделях.

Для конструирования рекомбинанта MVA, продуцирующего ВПЧ EBOV, нами была выбрана стратегия встройки генов VP40 и GP EBOV в разные участки генома MVA в связи с нестабильностью протяженных встроек в районы естественных делеций генома MVA (районы делеций II и III). На первом этапе был получен рекомбинант MVA со встройкой трансгена VP40 EBOV в районе делеции II с использованием плазмиды интеграции pDel2-mH5-VP40eb-Pat. Получившийся рекомбинантный штамм использовался в качестве реципиента для встройки более протяженного и сложного по структуре гена GP EBOV в межгенный промежуток 18R — G1L, отличающийся высокой структурной стабильностью, с использованием сконструированной плазмиды интеграции pIGR-mH5-GPopt-Pat.

Вестерн-блот анализ подтвердил экспрессию трансгенов EBOV в составе рекомбинантного штамма MVA-GP-VP40-EBOV. Оба белка GP и VP40 EBOV выявляются как в лизатах, так и в культуральной среде инфицированных клеток, что может происходить только в том случае, если они секретируются в виде ВПЧ.

Оценку иммуногенности штамма MVA-GP-VP40-EBOV проводили на модели морских свинок чувствительных к летальной инфекции EBOV. ИФА сывороток морских свинок, полученных через 4 недели после двукратной иммунизации рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-EBOV, выявил наличие антител к вирусу Эбола в титрах от 1 : 800 до 1 : 51200.

В результате проделанной работы получен рекомбинантный штамм вируса осповакцины MVA-GP-VP40-EBOV, экспрессирующий кассету генов структурных белков вируса Эбола с образованием иммуногенных ВПЧ, имитирующих природную инфекцию вируса.

© А. В. Семенова, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева, С. А. Пьянков, И. С. Шульгина, Г. В. Кочнева, 2021

АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ИНФЕКЦИЮ BALB/C МЫШЕЙ ШТАММОМ LIVP ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ*

А. А. Сергеев, С. Н. Якубицкий, К. А. Титова, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, А. М. Задорожный, Д. Н. Кисаков, И. С. Шульгина, С. А. Пьянков, И. В. Колосова, Л. И. Карпенко, С. Н. Щелкунов

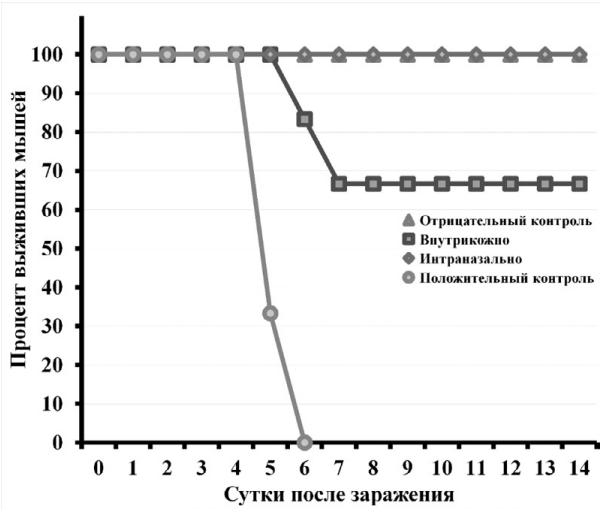
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзор, р. п. Кольцово

E-mail: aaserg@ngs.ru

Аннотация

В исследовании представлены результаты изучения развития гуморального и клеточного иммунных ответов у BALB/c мышей, интраназально или внутрикожно вакцинированных штаммом LIVP вируса осповакцины, который использовался в России в качестве оспенной вакцины первого поколения. При использовании одинаковой дозы вируса, но разных способов иммунизации мышей, наблюдалось отличие в протективной эффективности вакцинного штамма. Полученные результаты свидетельствуют о том, что решающую роль в защите животных от повторной ортопоксвирусной инфекции играет уровень развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию.

Важнейшую роль в глобальной ликвидации оспы сыграла массовая вакцинация. В качестве живой вакцины в разных странах использовали различные штаммы вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV), происхождение которых в большинстве случаев не было четко документировано. Эти штаммы VACV различались между собой по патогенности при инфицировании различных видов лабораторных животных и по реактогенности при вакцинации людей. В данной работе выполнено изучение развития гуморального и клеточного иммунных ответов у BALB/c мышей, интраназально (и/н) или внутрикожно (в/к, в нижнюю часть спины) вакцинированных в дозе 10^5 БОЕ/мышь штаммом VACV LIVP, который использовался в России в качестве оспенной вакцины первого поколения. На 7-е сутки после инфицирования у мышей наблюдали активный синтез VACV-специфичных IgM, достигающий максимума на 14-е сутки и снижающийся к 29 суткам. Синтез вирус-специфичных IgG выявляли только на 14-е сутки и их уровень существенно увеличивался к 29 суткам после инфицирования мышей. Интраназальная иммунизация приводила к достоверно большей продукции VACV-специфичных антител по сравнению с в/к введением LIVP. При обоих способах иммунизации максимальный уровень VACV-специфичных Т-клеток обнаруживали на 14-е сутки. К 29 суткам эксперимента уровень VACV-специфичных Т-лимфоцитов в селезенках мышей существенно снижался и был соизмерим для обоих методов иммунизации. На 30-е сутки после иммунизации LIVP мышей заражали вирусом оспы коров в дозе 46 $ЛД_{50}$ (см. рисунок). Интраназально-иммунизированные мыши были устойчивы к такой инфекции, а 33 % в/к иммунизированных мышей погибли. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что решающую роль в защите животных от повторной ортопоксвирусной инфекции играет уровень развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию.



Динамика гибели мышей, иммунизированных внутрикожно и интраназально штаммом LIVP вируса осповакцины в дозе 10^5 БОЕ, после их интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 46 $ЛД_{50}$ на 30-е сутки эксперимента. Приведены данные для групп из 6 животных, иммунизированных разными способами соответствующим вирусом, а также не иммунизированных групп и не инфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 (положительный контроль)

© А. А. Сергеев, С. Н. Якубицкий, К. А. Титова, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, А. М. Задорожный, Д. Н. Кисаков, И. С. Шульгина, С. А. Пьянков, И. В. Колосова, Л. И. Карпенко, С. Н. Щелкунов, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006).

АНАЛИЗ БИСПЕЦИФИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ*

А. И. Ситникова[1], А. М. Тимофеева[1], Л. В. Максименко[2], С. Е. Седых[1,3]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: bezuka@mail.ru

Аннотация

Из крови ВИЧ-инфицированных доноров (преобладающий суб-субтип вируса А6) в возрасте от 29 до 50 лет, с вирусной нагрузкой от 20 до 120000 копий/мл, выделены препараты IgG. Проанализировано соотношение подклассов IgG1–IgG4, проведен скрининг ДНК-гидролизующей и амилолитической активностей для каждого донора. Из суммарного пула IgG десяти ВИЧ-инфицированных доноров аффинной хроматографией выделены κκ-IgG, λλ-IgG и химерные κλ-IgG. В полученных субфракциях IgG определены подклассы IgG1–IgG4, ДНК-гидролизующая и амилотитическая активности.

В ходе работы получены электрофоретически и иммунологически гомогенные препараты IgG 26 ВИЧ-инфицированных доноров (выделение проводили на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), 22 донора находились на третьей стадии заболевания (присутствовали также доноры с 4А, 2А и 2Б), все доноры не принимали антиретровирусную терапию, преобладающий суб-субтип вируса — А6, вирусная нагрузка от 20 до 120000 копий/мл.

Для каждого донора проанализировали соотношение подклассов IgG1–IgG4: у 15 доноров преобладали IgG1 (50,4 % IgG1 от всех IgG), у остальных — IgG2 (32,1 % IgG2 от всех IgG). У трех доноров (стадия 4А и два донора на стадии 3) отмечено значительное преобладание IgG1 (60,0 ± 0,1 %) > IgG2 (20,1 ± 2,1). У остальных доноров преобладали IgG2 (46,7 % IgG2 от всех IgG) > IgG1 (35,1 % IgG1 от всех IgG). У всех доноров содержание IgG3 (12,8 %) превышало IgG4 (5,3 %).

Проведен анализ ДНК-гидролизующей и амилолитической активностей IgG для каждого из 26 доноров: показано, что большая часть антител доноров активна в гидролизе плазмидной суперскрученной ДНК и мальтогептозы, что соответствует ранее полученным в нашей лаборатории данным. Уровень каталитической активность индивидуален для каждого донора, IgG четырех доноров не гидролизовали данные субстраты.

Суммарный препарат IgG (смесь по 1 мг IgG от 10 доноров) разделен субфракции, содержащие различные сочетания легких цепей при помощи аффинной хроматографии на колонках KappaSelect и LambdaSelect (GE Life Sciences) согласно ранее разработанной в нашей лаборатории методике. Таким образом было выделено по 3 субфракции антител: κκ-IgG, λλ-IgG и химерные κλ-IgG. Дальнейшая работа была направлена на анализ антител, входящих в состав данных субфракций. Проведено тестирование подклассов IgG в полученных субфракциях. В случае для λλ-IgG: IgG1 (57,1 %) > IgG2 (35,5 %) > IgG3 (5,0 %) > IgG4 (2,3 %); для κκ-IgG: IgG1 (55,8 %) > IgG2 (34,2 %) > IgG3 (7,4 %) > IgG4 (2,6 %); для κλ-IgG: IgG2 (51,5 %) > IgG1 (37,1 %) > IgG3 (7,5 %) > IgG4 (3,9 %). Таким образом, в субфракции κκ-IgG, λλ-IgG преобладали IgG1, в κλ-IgG, наоборот, IgG2. Анализ ДНК-гидролизующей и амилотитической активности полученных субфракций κκ-IgG, λλ-IgG и химерных κλ-IgG не обнаружил статистически значимых различий между выделенными субфракциями антител.

В данной работе впервые показано, что кровь ВИЧ-инфицированных доноров содержит химерные биспецифичные κλ-IgG. Проведен анализ содержание подклассов IgG в данной субфракции, показано, что κλ-IgG содержат больше IgG2, чем IgG1.

© А. И. Ситникова, А. М. Тимофеева, Л. В. Максименко, С. Е. Седых, 2021

* Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного РФФИ 20-34-70115 (рук. С. Е. Седых).

ASSESSMENT OF THE INFECTIOUS LOAD IN THE POTATO FIELD AGROECOSYSTEM AND ITS MANIFESTATIONS

O. A. Sobko, N. V. Matsishina, P. V. Fisenko, I. V. Kim

Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A. K. Chaika, Ussuriysk

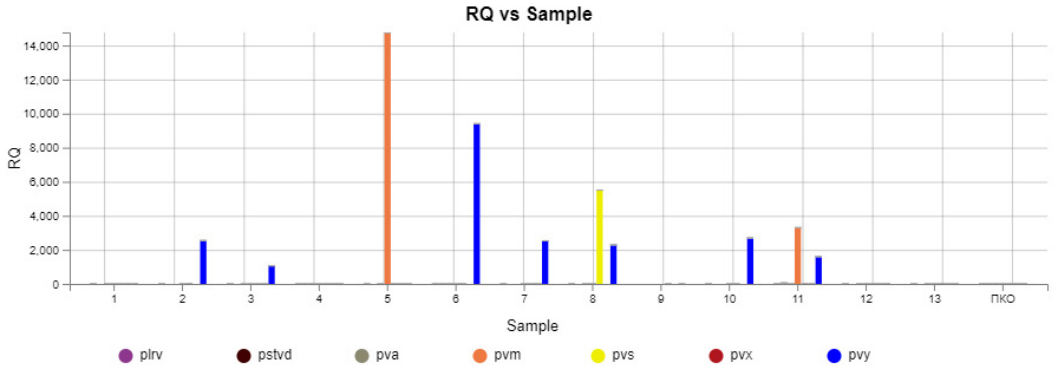
E-mail: o.eyvazova@gmail.com

Abstract

The results of a study are presented, during which the manifestations of symptoms of phytoviruses of the mosaic group (PVY, PVX, PVA, PVS, PVM), PLRV, and PSTDv on varieties *Solanum tuberosum* L. and *Petunia* sp are shown, depending on their concentration and ratio in plants.

Viruses are systemic, pantropic immunosuppressants with a pronounced tendency towards chronicity and recurrence of the process, as well as, in some cases, latent infection of plants. At the experimental site in 2021, by PCR methods [1] on *Solanum tuberosum* we detected an associative viral infection, including phytoviruses of the mosaic group: PVY, PVX, PVA, PVS, PVM, as well as PLRV and PSTDv. The distribution of the viral load by varieties was not the same, and the manifestations of complex viral infection on plants differed depending on the infectious load. Moreover, the manifestation of symptoms on potatoes depended on both the qualitative and quantitative composition of phytoviruses.

On plants of the Smak variety, the symptoms depended on the presence or absence of a particular virus, as well as their quantitative ratio. For plants in which PVY and PVS predominated, only leaf mosaic was observed. When PVM, PLRV, and PSTDv were added, in addition to mosaic, the curly edge of the leaf plate, the buds that did not open, and the rolled flower petals were observed. Moreover, there was a decrease in the concentration of PVY and PVS in these plants.



The manifestation of phytoviruses in potato and petunia varieties: 1 — Labella I, 2 — Laperla I, 3 — Labella II, 4 — Red Lady, 5 — Augustine, 6 — Smak I, 7 — Yantar, 8 — Belmonda, 9 — *Petunia sp.* I, 10 — *Petunia sp.* II, 11 — Smak II, 12 — Sante, 13 — Laperla II

For the Laperla variety, with an increase in the PVY concentration in plants, with almost the same ratios of all other phytoviruses, the following clinical picture was observed: marginal chlorosis and necrosis of the leaf plate, mosaic, dwarfism, and convexity of the leaf plate.

In the Labella variety, PVY, PVX, PVA, PVS, PVM, and PLRV viruses in low concentrations were manifested only by chlorosis, with an increase in the PVY concentration in the plant by 7 thousand times, PVM by 90 times, and PVS by 2 times, except for chlorosis of the leaf plate was observed brightly pronounced mosaic, uniform uncharacteristic yellow color of the leaves.

In the Augustine variety, a high concentration of PVM was manifested by crinkle, on the Smak variety, an increase in PVM by 10.5 times in combination with PVY led to the same clinical picture. In the Belmonda variety, only in the case of both PVY and PVS high concentration, crinkle was observed, without any other symptoms, as well as in the Red Lady cultivar. In the Sante variety, a pink border along the edge of the leaf was observed in the presence of PVY, PVX, PVA, PVS, PVM, and PLRV in plants, on the Augustine variety, the same phytoviruses were manifested by mosaic and chlorosis.

© O. A. Sobko, N. V. Matsishina, P. V. Fisenko, I. V. Kim, 2021

Petunia sp. was used as a bioindicator, with an increase in the concentration of PVY by 18 thousand times, red or purple strokes and spots appeared on the petals, depending on the color of the flowers, the veins on the leaves lightened, the leaf plate itself remained green. A lower concentration of phytovirus did not cause visible symptoms, which indicates a latent course of infection.

Thus, we have described the symptoms of PVY, PVX, PVA, PVS, PVM, as well as PLRV and PSTDv in potato varieties, depending on the concentration and ratio of these viruses in plants.

References

1. Ryabushkina N. A., Omasheva M. E., Galiakparov N. N. Specificity of DNA extraction from plant objects, Biotechnology // Thea ory and Practice. 2012. Vol. 2.

ПОЛИРЕАКТИВНОСТЬ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ ПРОТИВ S-БЕЛКА SARS-COV-2 У ПЕРЕБОЛЕВШИХ И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДОНОРОВ *

А. М. Тимофеева [1], О. Н. Котова [1], С. Е. Седых [1, 2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: anna.m.timofeeva@gmail.com

Аннотация

Из плазмы крови 75 доноров, переболевших COVID-19 и вакцинированных Sputnik V, выделены препараты IgG. Образцы плазмы доноров протестированы на наличие антител к белкам вируса SARS-CoV-2. Выделены три когорты доноров по 25 человек: перенесшие COVID-19 и имеющие высокий титр антител, со средним титром антител и вакцинированные с высоким титром (которые не имели антител до вакцинации). Из суммарных препаратов антител трех когорт доноров на сорбентах с иммобилизованным RBD и S-белками выделены иммуноглобулины класса G. Проведено тестирование подклассов IgG, определена перекрестная специфичность антител.

Иммуноферментным анализом на тест-системах производства Generium и Вектор-Бест определено содержание IgG против S-белка коронавируса SARS-CoV-2. Положительный результат свидетельствовал о предшествующей инфекции SARS-CoV-2, либо о вакцинации от данной инфекции. По результатам первичного скрининга более 500 переболевших и вакцинированных доноров, выделены три когорты доноров по 25 человек: перенесшие COVID-19 с высоким титром антител, со средним титром антител и вакцинированные с высоким титром (с отрицательным титром антител до вакцинации). Следует отметить, что все доноры перенесли COVID-19 в средне-тяжелой форме, и с момента появления первых симптомов прошло не менее 6 недель.

Аффинной хроматографией на Protein-G-Sepharose выделены индивидуальные препараты IgG доноров, показана электрофоретическая гомогенность полученных препаратов IgG. Препараты антител разделяли аффинной хроматографией на сорбентах, содержащих иммобилизованные рекомбинантные белки RBD и S-белок SARS-CoV-2, получали субфракции антител с различным сродством к антигенам коронавируса. Интересно, что хроматография антител на RBD-сефарозе не позволила выделить сколько-нибудь значимые субфракции, вероятно потому, что процент таких антител в суммарном пуле IgG слишком мал. Использование суммарных препаратов IgG — по 1 мг антител от каждого из 25 доноров, трех когорт доноров, позволил получить субфракции, с которыми можно было проводить дальнейший анализ.

Из суммарного пула антител выделены фракции обладающие сродством к RBD (RBD-IgG). Анализ профиля хроматографии показал, что содержание RBD-IgG в плазме крови переболевших COVID-19 и вакцинированных против вируса SARS-CoV-2 оставляет лишь 1,1–1,4 %. После хроматографии на RBD-сефарозе, проскок был нанесен на сефарозу и иммобилизованным S-белком. Получены антитела, обладающие сродством к другим доменам S-белка. Количество таких антител S*-IgG составило лишь 0,2–0,6 %.

Анализ подклассов IgG методом ИФА показал, что соотношение между IgG1–IgG4 уникально для каждого донора. У ряда доноров преобладают IgG1, у других — IgG2. Определенное относительное содержание IgG1–IgG4 в целом соответствует литературным данным.

Оценен вклад каждого подкласса в субфракцию RBD-IgG и S*-IgG. В то время как у одних доноров преобладали IgG1, а у других — IgG2, во всех суммарных препаратах переболевших и вакцинированных доноров соотношение IgG1 : IgG2 составляло практически 1 : 1, что соответствует распределению этих подклассов в исследованной популяции доноров.

Соотношение подклассов IgG1–IgG4 RBD-IgG соответствует соотношению в суммарных препаратах: IgG1 : IgG2 = 1 : 1, IgG1 > IgG3 > IgG4. Однако в случае S*-IgG наблюдается иная картина: в отличие от вакцинированных Sputnik V, у переболевших COVID-19 как с высоким, так и средним титром значительно преобладают IgG2, и IgG4 > IgG3 в отличие от доноров, вакцинированных Sputnik V.

Полученные данные указывают на различия в спектре антител, образующихся при иммунном ответе против S-белка у переболевших COVID-19 и вакцинированных Sputnik V.

© А. М. Тимофеева, О. Н. Котова, С. Е. Седых, 2021

* Работа выполнена при поддержке РНФ 21-75-10105 (рук. А. М. Тимофеева).

РАЗДЕЛ 4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

I

DISTINGUISHING HIGH FROM LOW CONCENTRATIONS OF RNA CANCER MARKER: 5-INPUT BINARY DEOXYRIBOZYME THRESHOLDING GATE

M. A. Y. Nour[1], J. Wanjohi[1], A. A. Eldeeb[1], D. M. Kolpashchikov[1,2]

[1] *SCAMT Laboratory, ITMO University, St. Petersburg*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: moustapha@scamt-itmo.ru

Abstract

According to the world health organization in 2020, 19,3 million new cancer cases and almost 10,0 million cancer death [1]. The rapid increase in the number of cancer cases worldwide has created among scientists an urgent requirement to develop effective therapies and treatments. Oligonucleotide therapies have emerged as a promising therapeutical approach. In this study we aimed to design a 5-input binary deoxyribozyme thresholding (5i-BDz) gate that cleaves specific RNA cancer cells only at higher concentrations of cancer biomarker microRNA, exhibiting low cleavage efficiency at lower cancer marker concentrations. 5i-BDz has the edge over other gene therapy approaches because it minimizes and eliminates the risks of damaging healthy and normal cells.

Deoxyribozymes or DNAzymes are single-stranded DNA oligonucleotides that catalyze chemical reactions. This (5i-BDz) nanomachine is derived from 10–23 DNAzyme isolated in 1994. DNA enzyme was not discovered in living cells it is usually obtained by *in vitro* selection from a DNA reservoir. The catalytic core is packed between two sequences of nucleotides that are complementary to the target RNA sequences. RNA cleavage occurs once the arms bind to the RNA in the specific site which will give the catalytic core the ability to form tertiary structures around the cleavage site and catalyze the cleavage [2, 3].

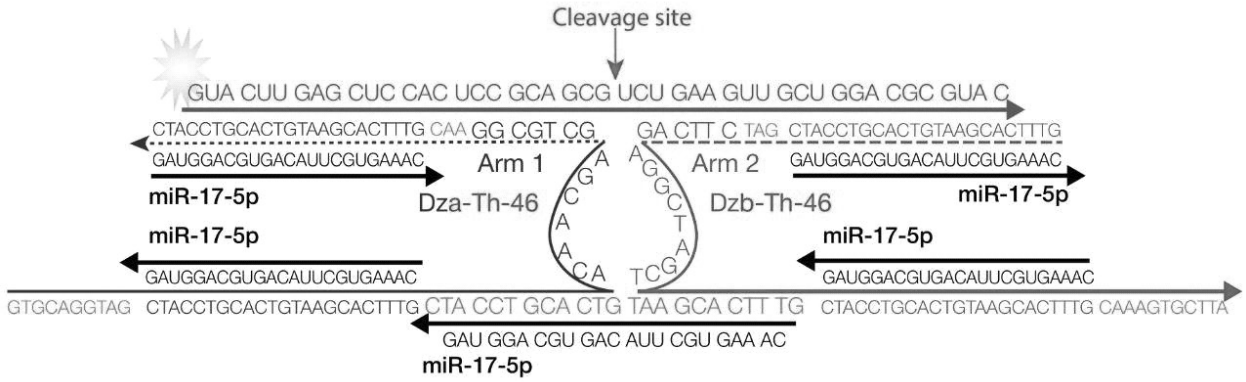


Fig. 1. Design of 5-input thresholding Binary deoxyribozyme (BDZ-5i) targeting artificial RNA-46 which is a fragment in the ORF of the house keeping gene DAD-1 (Defender against cell Death)

© M. A. Y. Nour, J. Wanjohi, A. A. Eldeeb, D. M. Kolpashchikov, 2021

The greatest challenge was in designing novel molecules for gene therapy has been attributed to three major factors: poor accessibility, off-targets, and efficiency of RNA targets. For example, an 10–23 DNAzyme can be split into two parts to produce a binary construct, and can be activated by a cancer marker example micro-RNA to be capable to cleave another vital mRNA target for example, housekeeping gene transcript, this action should be exclusively inside cancer cells [4]. We developed and optimized the binary DNAzyme into 5 input thresholder gate in which the input binding arms and the substrate-binding arms in the two strands have four loops in total. The (5i-BDZ) can recognize the cancer cell because of the loop in the input binding arm. This loop requires five times amount of the input of the over-expressed cancer marker to enable the catalytic activity towards the mRNA of the housekeeping gene (fig. 1).

We can clearly see that the threshold system is well respected (fig. 2), that each gate is activated at a specific needed concentration for example, yes gate, 2 input gate, 3 input gate, and 5input gate were activated at input concentration 0,5nM,5nM,6nM, and 20nM respectively and they reached the maximum activity at 10nM,20nM,35nM,50nM respectively. This opens up a range of opportunities for the field of specific cancer-treating molecular robotics.

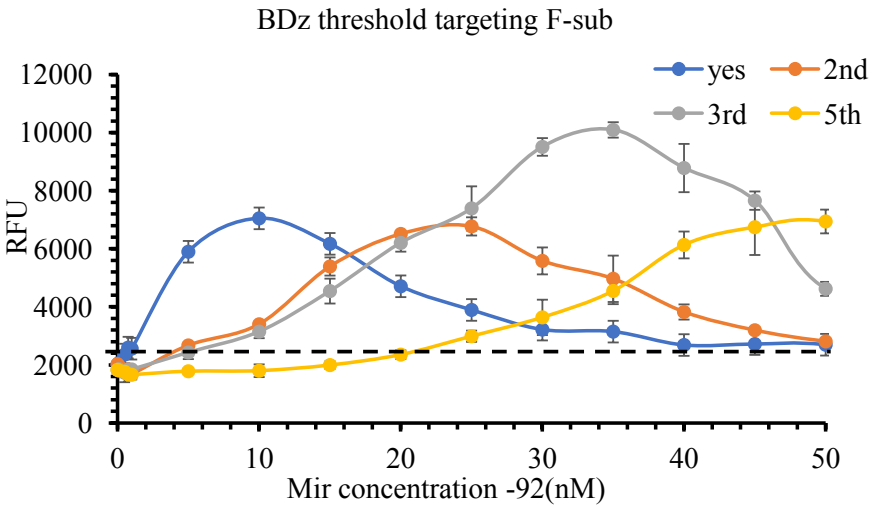


Fig. 2. Evaluation of the F-sub cleavage activity of the four different gates, the reaction was incubated at 37 °C for 1 h, followed by fluorescence spectrophotometry recording and analyzing. The data are average values of three independent measurements

Reference

1. Cancer [Electronic resource]. URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer (accessed: 20.04.2021)

2. Kolpashchikov D. M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Acc. Chem. Res. American Chemical Society. 2019. Vol. 52. No 7. P. 1949–1956.

3. Oliveira A. G. G. de et al. RNA-Cleaving DNA Thresholder Controlled by Concentrations of miRNA Cancer Marker // ChemBioChem. 2021.

4. Nedorezova D. D. et al. Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy // ChemBioChem. 2020. Vol. 21. No 5. P. 607–611.

ВЛИЯНИЕ КОРОТКОГО СВЕТОВОГО ДНЯ НА ПОВЕДЕНИЕ И СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА У ЛИНИЙ МЫШЕЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К КАТАЛЕПСИИ

С. Н. Адонина, Д. В. Базовкина

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: sveta-adonina@yandex.ru; daryabazovkina@gmail.com

Аннотация

Сезонные аффективные расстройства (САР) — это комплекс нарушений поведения, возникающих, по данным ВОЗ, вследствие уменьшения длительности световой фазы дня примерно у 20 % населения в осенне-зимний период года. Считается, что возникновение симптомов САР связано с дисбалансом циркадных ритмов и серотониновой (5-НТ) системы мозга. Однако патофизиологические и генетические механизмы возникновения этих расстройств остаются малоизученными. Поэтому создание адекватных моделей САР на грызунах является важной и актуальной проблемой.

Целью данной работы было изучение влияния короткого светового дня на поведение и серотониновую систему мозга у мышей некаталептической линии C57BL/6J и линии CBA/Lac с генетической предрасположенностью к патологической каталептической реакции.

Самцы (4–5 недель) опытных групп находились в условиях короткого светового дня (свет/темнота: 4/20 ч) в течение 6 недель, в это время животные контрольных групп содержались при стандартных условиях (свет/темнота: 14/8 ч). Изменения в поведении оценивали с помощью тестов «открытое поле», «принудительное плавание», «подвешивание за хвост» и «щипковая каталепсия».

Экспрессия генов, кодирующих основные звенья 5-НТ системы, оценивалась методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни 5-НТ и его метаболита 5-HIAA в структурах мозга (префронтальная кора, гиппокамп, средний мозг, гипоталамус) исследовали методом ВЭЖХ.

Пребывание в условиях короткого фотопериода привело к устойчивым депрессивно-подобным изменениям в поведении у мышей обеих линий, а также усилению каталептического замирания у животных CBA/Lac ($p < 0,05$) по сравнению с мышами соответствующих контрольных групп.

Снижение уровня серотонина в гипоталамусе ($p < 0,05$), гиппокампе ($p < 0,05$) и уровня его метаболита 5-ГИУК в гипоталамусе ($p < 0,05$) было отмечено только у мышей каталептической линии CBA/Lac в условиях содержания при укороченном световом дне.

Пребывание в условиях короткого фотопериода привело к снижению экспрессии генов 5-HT1A рецепторов в коре ($p < 0,05$) у мышей линии C57Bl/6, а также падению экспрессии генов 5-HT1A и 5-HT7 рецепторов в гиппокампе ($p < 0,05$) и гена триптофангидроксилазы 2 — в среднем мозге ($p < 0,05$) у мышей линии CBA/Lac.

Усиление показателей депрессивно-подобного поведения в условиях укороченного светового дня наблюдалось у мышей обеих линий и сопровождалось снижением функциональной активности серотониновой нейромедиаторной системы, причем у животных каталептической линии CBA эти изменения были более значительными. Таким образом, линия мышей CBA представляет собой адекватную и перспективную модель для изучения молекулярно-биологических и физиологических механизмов действия короткого фотопериода.

© С. Н. Адонина, Д. В. Базовкина, 2021

SPLIT DEOXYRIBOZYME (DZ) MACHINES FOR CLEAVAGE OF FOLDED RNA TARGETS

A. I. Andriianova[1], D. D. Nedorezova[1], V. S. Andriyanov[1], D. M. Kolpashchikov[1,2]

[1] *ITMO University, SCAMT laboratory, Russia*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: andriianova@scamt-itmo.ru

Abstract

RNA cleaving deoxyribozymes (DZs) have been proposed as gene therapy agents for suppression of targeted mRNAs in living cells. The technology, however, straggles with the low selectivity of RNA cleavage *in vivo*. We addressed one of the greatest challenges of the DZ-based technology — accessing cleavage site in folded RNA structures by incorporating split DZ in the context of a DNA nanostructures capable of unwinding stable RNA structure, named here DNA nanomachines (DMs). Since better understanding of the catalytic activity of different designs allows to simplify and accelerate the constructions creation for the new targets, in this research were investigated the catalytic properties of split DZ and split DM.

Deoxyribozymes (DZs) are single stranded DNA oligonucleotides that catalyze cleavage of RNA molecules. DZ split in two parts (split DZ) with separated cancer marker recognition from RNA-cleaving function (fig. 1A), cleaves messenger RNA of a vital housekeeping gene (target RNA) only in the presence of a cancer biomarker sequence.

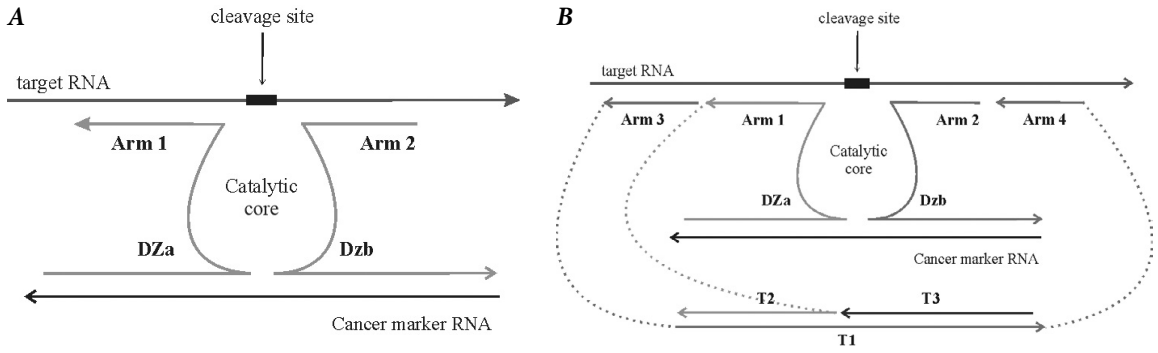


Fig. 1. A — split deoxyribozyme; *B* — split DZ-based DNA machine

More sophisticated construction is a split DZ-based DNA nanomachine (DM) for cancer treatment (fig. 1B) which can act as a highly targeted molecule and at the same time improves catalytic activity of DZ by unwinding stable secondary structure of the target RNAs due to the additional arms (Arm 3 and 4). Investigation of the catalytic activity of various designs to identify common patterns will allow to simplify and accelerate development of the constructions for new RNA targets.

In this research we investigated the efficiency of split DZs systems and split DZ-based DMs for cleavage of target DAD1-RNA-46, GFP-RNA-60 — synthesized RNA sequences identical to the parts of mRNAs of *DAD1* and *GFP* genes. Based on the obtained results split DZs and split DMs for the cleavage of other RNA targets (mRNA of bacterial genes str and infB) were developed.

It was found that GFP-RNA-60 target is almost two times easier cleavable than DAD1-RNA-46 target (fig. 2), although both targets had stable secondary structures with similar Gibbs free energies. This may be due to the fact, that DAD1-RNA-46 has more stable structure near the cleavage site. Thus, RNA cleavage is mainly dependent on the Gibbs free energy of the target molecule structure near the cleavage site. Moreover, the most efficient DM for DAD1 cleavage was found to be 1,35 times more effective than initial split DZ, while in case of GFP cleavage the best DZ shows almost the same efficacy as the best DM (all comparisons are made for the 5-hour point). In comparison with the DZs for DAD1-RNA-46 cleavage DZs for GFP-RNA-60 show lower melting temperature: the melting temperature of the best DZ for DAD1 cleavage, 9/11(Tm = 7/36 for arm1/2), is close to the temperature of incubation (37 °C) while for GFP, 9/10 (Tm = 26/33 for arm1/2) the temperatures are lower. Almost the same temperature pattern is observed in DM for arms 1 and 2 linked with a core part, the DMs 8/10/9/7 (Tm = 32/31/25/24 for arm1/2/3/4) and 9/10/8/8 (Tm = 26/27/25/28 for arm 1/2/3/4) for DAD1-RNA-46 and GFP-RNA-60 cleavage respectfully. While the arms 3 and 4 of DMs, involved into unwinding of RNA's secondary structure, in both constructions have similar melting temperatures.

© A. I. Andriianova, D. D. Nedorezova, V. S. Andriyanov, D. M. Kolpashchikov, 2021

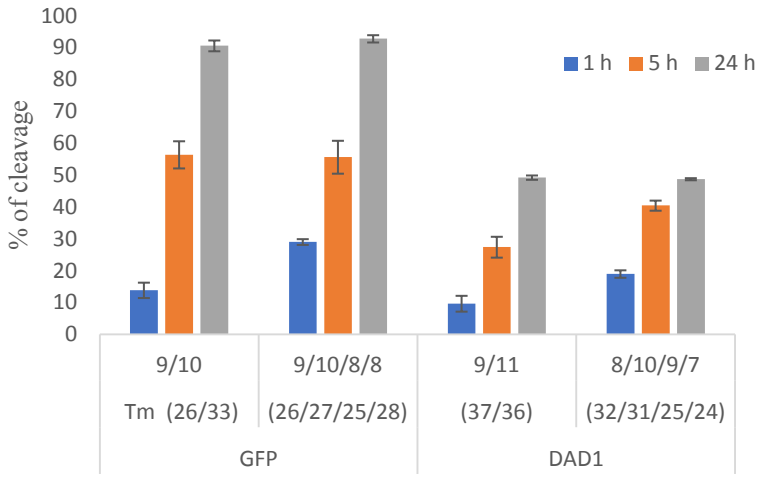


Fig. 2. Cleavage efficiency of best DZ and DM

At the next stage, will be tested DZs and DMs against str and infB RNAs which are constructed based on the results obtained on DAD1-RNA-46 and GFP-RNA-60 targets.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *M. TUBERCULOSIS* СРЕДИ НОВЫХ СЛУЧАЕВ В КАЗАХСТАНЕ

А. Ж. Ахметова[1,2], А. Р. Акильжанова[1,2], У. А. Кожамкулов[1]

[1] *Назарбаев университет, Нур-Султан, Казахстан*
[2] *Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан*

E-mail: ainur.akhmetova2@nu.edu.kz

Казахстан входит в список 30 стран с высокими показателями мультирезистентного туберкулеза в мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в 2018 г. в Казахстане показатель мультирезистентного туберкулеза, который характеризуется устойчивостью к самым эффективным противотуберкулезным препаратам (ПТП) 1-го ряда — рифампицину и изониазиду, составил 26 случаев на 100 тыс. населения. Целью данного исследования является оценка генетического разнообразия мультирезистентных клинических изолятов *M. tuberculosis* среди новых случаев легочного туберкулеза.

Сто шестнадцать мультирезистентных клинических изолятов *M. tuberculosis* были собраны среди новых случаев туберкулеза из различных областей Казахстана. Метод абсолютных концентраций и BACTEC-MGIT 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube были использованы для определения лекарственной чувствительности к ПТП 1 ряда. Генотипирование всех мультирезистентных клинических изолятов было проведено методом MIRU-VNTR по 15 локусам. Веб приложение MIRU-VNTRplus было использовано для построения филогенетического древа методом UPGMA и определения *M. tuberculosis* семейств. Референтный штамм H37Rv был использован в качестве положительного контроля.

В результате 15 MIRU-VNTR генотипирования было определено 32 генотипа. 24 (20,7 %) генотипа были уникальными и были представлены только в одном изоляте среди 116 мультирезистентных клинических изолятов *M. tuberculosis*. Остальные 92 (79,3 %) мультирезистентных изолятов были объединены в 8 кластеров, которые включали в себя от 3 до 65 изолятов в кластере, 84,5 % (n = 98) мультирезистентных изолятов принадлежали семейству Beijing. Вторым по значимости семейством идентифицированным среди мультирезистентных клинических изолятов является LAM (12,1 %, n = 14). Семейство URAL было найдено в двух случаях — 1,7 %. Семейство Haarlem и NEW-1 были определены в 0,85 % случаях каждое.

Результаты MIRU-VNTR генотипирования показали, что изоляты семейства Beijing широко распространены среди новых мультирезистентных случаев в Казахстане и были идентифицированы в 84,5 % случаев. Изоляты семейства Beijing в нашем исследовании были определены у относительно молодых людей в возрасте 18–50 лет (76/98, 77,5 %). Поэтому важно внедрение методов генотипирования в клиническую практику для диагностики и мониторинга изолятов семейства Beijing среди мультирезистентного туберкулеза в Казахстане.

© А. Ж. Ахметова, А. Р. Акильжанова, У. А. Кожамкулов, 2021

AHR-РЕГУЛИРУЕМЫЕ И PD-L1-РЕГУЛИРУЮЩИЕ МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Д. А. Ахметова[1], В. В. Кончук[2]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*

E-mail: dinara.arturovna@gmail.com

Аннотация

В данной работе была исследована взаимосвязь между относительным уровнем микроРНК в операционном материале и клинико-паталогическими характеристиками пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ). Была обнаружена связь между относительным уровнем экспрессии PD-L1-регулирующих микроРНК (микроРНК-155, -181a) и размером опухоли, наличием метастазов в лимфатических узлах.

Рак легкого занимает лидирующие позиции по распространенности относительно других видов злокачественных новообразований. Плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) является наиболее агрессивным подтипом этого рака. Поиск диагностических, прогностических и терапевтических маркеров для данных новообразований по-прежнему остается актуальной задачей. Такие маркеры можно искать среди микроРНК. МикроРНК — это малые некодирующие РНК, регулирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Для многих микроРНК показана связь их уровня с характеристиками новообразования определенного типа. Также стоит отметить высокую стабильность данных биомолекул и широкую представленность в различных биологических жидкостях. Данные свойства позволяют рассматривать микроРНК в качестве перспективных маркеров, исследовать которые можно малоинвазивно.

Нами были отобраны 2 группы микроРНК, потенциально ассоциированные с ПКРЛ:

1) PD-L1-регулирующие микроРНК. Одним из эффективных способов лечения ПКРЛ, является иммунотерапия, которая основана на применении моноклональных антител к PD1/PD-L1. Примерно треть пациентов с ПКРЛ имеют повышенный уровень белка PD-L1 в опухолевой ткани, что является показанием к применению иммунотерапии. Можно ожидать, что существует связь между характеристиками опухоли и уровнем PD-L1-регулирующих микроРНК. С использованием базы данных MirTarBase были отобраны следующие микроРНК: микроРНК-155, микроРНК-181a;

2) микроРНК, регулируемые арилгидрокарбоновым рецептором (AhR). Для AhR наиболее изученным лигандом является бензпирен. Данное вещество обладает канцерогенными свойствами и является одним из компонентов табачного дыма. Известно, что развитие ПКРЛ ассоциировано с курением. Таким образом, можно предполагать, что курение приводит к активации AhR, который, действуя как транскрипционный фактор, инициирует экспрессию ряда онкогенов, в том числе гена *PDL1. С использованием* литературных данных (данные иммунопреципетации) были отобраны микроРНК, регулируемые AhR: микроРНК-21, микроРНК-342.

Данное исследование проводилось на биоколлекции опухолевого и условно-нормального операционного материала пациентов с диагнозом ПКРЛ, созданной на базе торакального отделения Новосибирского клинического онкологического диспансера. Изменение относительного уровня микроРНК оценивалось методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Уровни микроРНК-342, потенциально регулируемой AhR, и микроРНК-181a, потенциально регулирующей PD-L1 были достоверно снижены в 3 раза в образцах ПКРЛ относительно нормальной ткани. Также показана связь PD-L1-регулирующих микроРНК с клинико-паталогическими характеристиками опухоли. Так, при увеличении размера опухоли (а именно в опухолях размера > 2 см) уровни микроРНК-155 и -181a были снижены в 4 и 2 раза, соответственно; при наличии метастазов в лимфатических узлах уровни микроРНК-155 и -181a оказались снижены в 3 и 2 раза, соответственно. Не было выявлено никакой ассоциации между уровнями микроРНК-155 и -181a и возрастом пациентов.

Таким образом, изменение экспрессии PD-L1-регулирующих микроРНК-181a и микроРНК-155 вероятно сопутствует прогрессии плоскоклеточного рака легкого и может выступать маркером некоторых характеристик опухоли.

© Д. А. Ахметова, В. В. Кончук, 2021

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ*

И. А. Бауэр[1,2], Е. В. Дмитриенко[1,2]

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

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

Аннотация

Разработка систем доставки противоопухолевых препаратов на основе человеческого сывороточного альбумина с повышенной специфичностью и контролируемым высвобождением представляет собой важную задачу современной молекулярной биологии и клинической медицины. В данной работе были исследованы нековалентные взаимодействия человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с биологически активными соединениями, такими как доксорубицин (DOX), фолиевая кислота и различные последовательности олигонуклеотидов. Методы кругового дихроизма (КД) и флуоресцентной спектроскопии были использованы для анализа сайтов связывания, констант связывания, а также влияния комплексообразования на стабильность и конформацию ЧСА.

Системы доставки на основе ЧСА привлекают внимание исследователей вследствие нетоксичности, биосовместимости и биоразлагаемости белка. Значит, его инъекции будут сопровождаться меньшими побочными эффектами, кроме того, ЧСА способен накапливаться в месте воспаления. Для повышения адресности конструкций на основе альбумина возможно использование различных направляющих на опухоль компонентов. Модификация белка легко осуществима благодаря наличию на альбумине множества сайтов связывания и функциональных групп.

Цель данной работы заключалась в исследовании нековалентных взаимодействий человеческого сывороточного альбумина с биологически активными соединениями для дальнейших биомедицинских применений. В качестве терапевтического агента был выбран доксорубицин — эффективное химиотерапевтическое средство для лечения рака, применение которого ограничено его высокой кардиотоксичностью и низкой специфичностью к раковым тканям. ЧСА, связываясь с доксорубицином, может снижать его токсичность и обеспечивать поддержание постоянной концентрации препарата в крови на протяжении длительного периода, а также способствовать его выведению из организма. В качестве нацеливающих лигандов были выбраны фолиевая кислота, специфически связывающаяся с фолатным рецептором, который сверх экспрессируется в раковых клетках, а также различные последовательности олигонуклеотидов. Анализ данных флуоресцентной спектроскопии показал, что при нековалентном взаимодействии ЧСА с биологически активными соединениями происходит тушение флуоресценции белка, обусловленной наличием остатка триптофана в его молекуле, что свидетельствует об образовании комплексов ЧСА-лиганд. В ходе исследований был установлен обратимый механизм связывания доксорубицина с ЧСА, зависящий от pH. Умеренное сродство связывания в слабых щелочных условиях может снизить концентрацию доксорубицина в плазме крови и, следовательно, уменьшить его токсичность для здоровых тканей. С другой стороны слабое связывание в кислых условиях может способствовать специфическому высвобождению доксорубицина в кислой среде опухолевых тканей. Результаты КД показывают, что при нековалентном взаимодействии ЧСА с представленными биологически активными соединениями изменяется содержание α-спиралей. Однако значительных изменений во вторичной структуре белка не наблюдается. Таким образом, человеческий сывороточный альбумин является перспективной основой систем доставки противоопухолевых препаратов, чувствительных к микроокружению, с пониженной токсичностью и повышенной эффективностью.

© И. А. Бауэр, Е. В. Дмитриенко, 2021

* Работа выполнена при поддержке базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № 121031300042-1 и РНФ 21-64-00017.

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ОСНОВНОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ПРОТЕАЗЫ 3CL

С. В. Беленькая[1,2], В. Ю. Чиркова[3], Д. Н. Щербаков[2,3]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3] *Алтайский государственный университет, Барнаул*

E-mail: belenkaya.sveta@gmail.com

Аннотация

Проведено экспериментальное тестирование ингибирующей активности 30 соединений лигандов против главной протеазы SARS-CoV-2 (3CL). Протестированные соединения были ранее отобраны с использованием докинга и квантово-химического метода.

SARS-CoV-2 — это оболочечный одноцепочный (+)РНК-вирус, состоящий из четырех структурных белков и РНК генома. При попадании в клетку-хозяина вирусный геном транслируется с образованием двух перекрывающихся полипротеинов-pp1a и pp1ab. Основная протеаза 3CL вируса вырезается из полипротеинов за счет своей протеолитической активности и впоследствии вместе с папаин-подобной протеазой катализирует гидролиз полипротеинов с образованием 16 функциональных неструктурных белков [1]. Функциональные неструктурные белки в дальнейшем собираются в репликативно-транскрипционный комплекс, который участвует в синтезе минус-цепи РНК вируса. Вакцины критически важны для преодоления пандемии COVID-19, однако не менее важной задачей является разработка противовирусных препаратов способных подавлять репликацию коронавируса SARS-CoV-2.

Одним из подходов, позволяющих облегчить поиск новых веществ способных ингибировать активность ферментов, является использование методов молекулярного моделирования, в частности молекулярный докинг [2]. Программы докинга позиционируют молекулы кандидаты в активном центре белка-мишени и оценивают их энергию связывания. Чем выше эта энергия, тем более эффективнее будет лекарство на основе такого ингибитора, так как меньшая концентрация лекарства в организме даст нужный терапевтический эффект.

Целью данной работы являлась экспериментальная проверка ингибирующей способности 30-ти ранее отобранных соединений-лигандов. В тестирование были отобраны молекулы имеющие наиболее отрицательные значения скоринг-функции программы SOL и энтальпии связывания. Ингибирование определялось с использованием пептидного субстрата с флюоресцентной меткой, включающей сайт протеолиза главной протеазы 3CL.

В результате первого раунда измерений из 30-ти соединений одно показало активность по ингибированию главной протеазы SARS-CoV-2 в субмикромолярном и микромолярном диапазонах IC50. В результате дальнейшего отбора ингибиторов с помощью того же метода среди аналогов ингибитора, найденного в первом раунде, было экспериментально подтверждено еще 11 ингибиторов главной протеазы SARS-CoV-2, имеющих значения эффективной концентрации IC50 в диапазоне от 1 до 6 мкмоль. Найденные химически разнообразные ингибиторы могут быть использованы для оптимизации с целью получения лидерного соединения — основы новых антивирусных препаратов прямого действия на коронавирус SARS-CoV-2.

Литература

1. Thiel V. et al. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression // Journal of General Virology. 2003. Vol. 4. No 9. P. 2305–2315.

2. Сулимов В. Б., Сулимов А. В. Докинг: молекулярное моделирование для разработки лекарств. М.: ООО «Интелл». 2017.

© С. В. Беленькая, В. Ю. Чиркова, Д. Н. Щербаков, 2021

ЭФФЕКТ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА CC2D1A В ГИППОКАМПЕ НА ПОВЕДЕНИЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ BTBR — МОДЕЛИ АУТИСТИКОПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ*

И. И. Белокопытова, Е. М. Кондаурова, Е. А. Куликова, Т. В. Ильчибаева, В. С. Науменко

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: belokopytovaii@mail.ru

Аннотация

Мышам линии BTBR, которые являются общепризнанной моделью аутистикоподобного поведения, был введен в гиппокамп аденоассоциированный вирусный конструкт, несущий плазмиду pAAV SynH1-2_shRNA Freud-1, обеспечивающую снижение экспрессии гена *Cc2d1a*, что привело к достоверному снижению времени нахождения в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта. Полученные результаты указывают на снижение тревожности у животных.

Расстройства аутистического спектра это термин, используемый для описания совокупности проявлений дефицита социального взаимодействия и повторяющихся сенсорно-моторных форм поведения, связанных как с генетическими причинами, так и с другими факторами. Ген C*c2d1a* кодирует белок Freud-1 и регулирует независимо множество внутриклеточных сигнальных путей. Было показано, что ген C*c2d1a* играет важную роль в развитии мозга путем регуляции дифференцировки и выживаемости нейронов. Для эксперимента были выбраны мыши инбредной линии BTBR. Эти животные демонстрируют повторяющееся стереотипное поведение и снижение уровня социального взаимодействия. Ранее нами было показано, что по сравнению со стандартной линией C57BL6/J у мышей линии BTBR повышена экспрессия гена C*c2d1a*.

Исходя из вышесказанного целью данной работы стало изучение эффекта нокаута гена C*c2d1a* в гиппокампе на тревожность, стереотипное поведение, уровень социального взаимодействия, пространственную память и обучение.

Тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте показало, что мыши, которым вводились вирусные частицы с плазмидой pAAV SynH1-2_shRNA Freud-1, проводили меньше времени в закрытых рукавах лабиринта и больше — в открытых по сравнению с мышами из контрольной группы. Результаты этого теста показывают, что снижение экспрессии гена *Cc2d1a* приводит к снижению тревожности у мышей линии BTBR. Стереотипное поведение было оценено по количеству закопанных в подстил шариков, а уровень социального взаимодействия измерен как процент нахождения в камере с мышью в трехкамерном социальном тесте. Результаты двух этих тестов не показали достоверных отличий между контрольной и опытной группами. По результатам тестирования в водном лабиринте Морриса мыши как контрольной группы, так и опытной на пятый день проводили в целевом сегменте лабиринта достоверно больше времени по сравнению со случайной вероятностью нахождения в секторе, т. е. обучились находить платформу. Однако другие показатели в водном лабиринте Морриса (такие как путь до платформы, время поиска платформы) не изменились существенно между группами животных. Таким образом, введение конструкта не оказало влияния на пространственно-временную память.

Таким образом, впервые было показано влияние экспрессии гена *Cc2d1a* на тревожное поведение у мышей BTBR с аутистикоподобным поведением. Тревожное поведение часто является сопутствующим симптомом для людей с расстройством аутистического спектра.

© И. И. Белокопытова, Е. М. Кондаурова, Е. А. Куликова, Т. В. Ильчибаева, В. С. Науменко, 2021

* Работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00027. Животные содержались за счет средств бюджетного проекта № 0259-2021-0015. Работа реализована на оборудовании Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, при поддержке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ОЖИРЕНИЯ У СТУДЕНТОВ РАЗНЫХ НАЦИОНАЛЬНОСТЕЙ

А. А. Берсенева, Л. Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики —
филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ

E-mail: sashaart0611@gmail.com

Аннотация
Проведен ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа по генам ADRB2, ADRB3, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению у студентов разной этнической принадлежности.

Хорошо известно, что масса тела и склонность к ожирению обусловлены не только средовым воздействием (уровень физической активности, особенности питания и др.), но и генетическими факторами, оказывающими влияние на варьирование ИМТ в пределах 65–80 %. Известны десятки полиморфизмов генов, ассоциированных с предрасположенностью к ожирению [1]. Знание генетической предрасположенности позволит с раннего возраста корректировать пищевое поведение и физическую нагрузку, что приведет к уменьшению количества людей, страдающих тяжелой степенью ожирения.

Для выявления возможного полиморфизма, связанного с генами, ассоциированными с жировой массой ADRB2, ADRB3 было обследовано 64 студента ИАТЭ НИЯУ МИФИ разной этнической принадлежности. Студенты были разделены на четыре группы по страновой принадлежности: 1-я группа — европейские студенты — 25 человек, 2-я группа — африканские студенты — 20 человек, 3-я группа — вьетнамские студенты — 14 человек, 4-я группа — студенты разной национальности — 5 человек

Перед проведением анализа у всех обследуемых лиц провели сбор медико-генетических сведений, провели антропометрические измерения для расчета индекса массы тела (ИМТ). По результатам обследования большая часть обследуемых лиц — это 68,8 % студентов имеют нормальную массу тела, избыточную массу тела имеет 15,6 % от всех обследуемых лиц, 14,1 % студентов имеют дефицит массы тела, ожирение 1 степени **имеет** 1,6 % от всех обследуемых лиц. Для уточнения значения ИМТ у всех обследуемых лиц определили тип распределения жира в организме человека.

По результатам анкетирования, генетическую предрасположенность к ожирению мы предполагали у 39 % студентов. Для всех обследуемых лиц мы провели ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа по генам ADRB2, ADRB3, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению.

По результатам ПЦР-анализа можно было определить: нормальный вариант полиморфизма генов (мутация отсутствует), мутация в гетерозиготной форме (в одном из парных генов), мутация в гомозиготной форме (в обоих парных генах). Результаты представлены в табл. 1–2.

Таблица 1

Полиморфизм гена ADRB2

	Европейцы, %	**Африканцы, %**	**Вьетнамцы, %**	**Другие этносы, %**
Гомозигота по аллелю A (мутация отсутствует)	8	30	57,2	20
Гетерозигота	44	60	35,7	80
Гомозигота по аллелю G	48	10	7,1	0

Таблица 2

Полиморфизм гена ADRB3

	Европейцы, %	**Африканцы, %**	**Вьетнамцы, %**	**Другие этносы, %**
Гомозигота по аллелю T (мутация отсутствует)	92	65	78,6	60
Гетерозигота	8	35	21,4	40
Гомозигота по аллелю C	0	0	0	0

Результаты анализа генов на полиморфность подтвердили предрасположенность к ожирению у 96 % лиц, у которых как мы предполагали по данным анкетирования, имеется генетическая предрасположенность. Кроме

© А. А. Берсенева, Л. Н. Комарова, 2021

того, анализ показал наличие мутаций в генах ADRB2, ADRB3 у 74,4 % людей, у которых мы не предполагали предрасположенности к ожирению.

Представляет интерес дальнейшее изучение ассоциации генов-кандидатов развития ожирения и кластера метаболических параметров в других этнических группах России.

Литература

1. Насибул*ина* Э. С., Шагимардан*ова* Р. Р. Ассоциация полиморфизма гена FTO с избыточной массой тела в Российской популяции // Казанский медицинский журнал. 2012. № 5. С. 823–825.

IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN THE PROCESS OF STEM CELL DIFFERENTIATION INTO MUSCLE CELLS IN THE FREE-LIVING FLATWORM MACROSTOMUM LIGNANO *

M. Yu. Biryukov, A. M. Dmitrieva, E. L. Bazarova, K. V. Ustyantsev, E. V. Berezikov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

E-mail: birykov@bionet.nsc.ru

Abstract

The free-living flatworm *Macrostomum lignano* is known for its ability to regenerate using stem cells called neoblasts. It has recommended itself as a model organism for investigation of such processes as ageing, regeneration, and cell differentiation, in large part due to its amenability to transgenesis. Previously, multiple transgenic lines with fluorescent proteins expressed in different tissues and organs of *M. lignano* were obtained. To establish which transcription factors are required for differentiation of neoblasts into muscle cells, we used RNA-seq data from cells expressing both muscle and neoblast transgenic markers, and selected several candidate genes for gene knockdown by RNA interference method. For four of the candidate genes, we observed presumptive phenotypes of muscle tissue disorder.

Macrostomum lignano is a free-living flatworm with an impressive ability to regenerate itself. Because of its unique stem cells, neoblasts, *M. lignano* is a great model organism to study stem cells and regeneration, including mechanisms of stem cell differentiation.

In a previous studyc a *M. lignano* transgenic line was generated, in which muscle cells and neoblasts were marked with red and green fluorescent proteins respectively. This allowed us to isolate muscle cells, neoblasts, and muscle progenitor cells by fluorescence activated cell sorting (FACS) and perform RNA-seq analysis of these cell populations.

Based on the obtained RNA-seq data we selected six candidate genes (homologs of human *CREB1*, *PATZ1*, *CUX1*, *HOXA1*, *MEIS2*, *MYF6*) with increased expression levels in muscle progenitors and differentiated muscles compared to neoblasts. We next performed knock-down of these genes by RNA interference with double-stranded RNA (dsRNA) and analysed the resulting phenotypes using confocal microscopy. Transgenic worms with red fluorescent protein mScarlet-I expressed in muscle cells under the troponin gene homologue (*TNNT2*) promoter were used in the experiments. After 45 days of daily exposure to dsRNA tumor-like formations were observed in *CREB1* knockdown animals. Three-dimensional image reconstructed from Z-stack series of snapshots showed that the formations were presented by muscle tissue, and the muscle pattern was changed along the entire length of the animal. Less pronounced but similar changes were found in 3 other studied genes homologous to *PATZ1*, *CUX1*, *HOXA1*. These changes were represented by disorders of normal muscle patterns. Thus, for several candidate genes we have demonstrated their role in muscle formation from neoblasts.

© M. Yu. Biryukov, A. M. Dmitrieva, E. L. Bazarova, K. V. Ustyantsev, E. V. Berezikov, 2021

* The study was supported by the Russian Science Foundation grant No 20-14-00147.

THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTORS IN TRANSDIFFERENTIATION DURING REGENERATION IN SEA CUCUMBERS

A. V. Boyko, I. Yu. Dolmatov

A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS

E-mail: alteroldis@gmail.com

Abstract

The holothurian *Eupentacta fraudatrix* is a unique organism for studying regeneration mechanisms. It has been repeatedly confirmed that regeneration is only due to the transformation of terminally differentiated cells. In this study, we continued to examine changes in gene expression of previously found 11 TF genes during gut regeneration in the holothurian *E. fraudatrix*. We assume, that this TFs are candidates for the role of transdifferentiation regulators.

It is well-known that regeneration in *E. fraudatrix* is only due to the transformation of terminally differentiated cells. In addition, at the histological level, this process has been well studied previously. However, the molecular basis of cell transdifferentiation mechanisms in *E. fraudatrix* remains unknown. Previously, as result of sequencing of transcriptomes of intestinal anlage of the three stages of regeneration, as well as the normal gut, and analysis of obtained data we identified 308 transcription factors. After analysis the dynamics of gene expression during regeneration and the map of biological processes in which they participate, we identified 11 transcription factors (TFs): Ef-EGR, Ef-ELF, Ef-GATA3, Ef-ID, Ef-KLF1/2/4, Ef-MSC, Ef-PCGF2, Ef-PRDM9, Ef-SNAI2, Ef-TBX20, and Ef-TCF24. Excluding TCF24, they are all involved in the regeneration, development, epithelial-mesenchymal transition, and immune response in other animals [1]. We suggest that these transcription factors may also be involved in the transdifferentiation of coelomic epithelial cells into enterocytes in holothurians. In this work, we tried to determine the TFs, which are candidates for the role of transdifferentiation regulator.

Tissue of gut anlage was sampled on the third (first stage of regeneration), fifth and seventh (second stage, apart), and tenth (third stage) days of regeneration. Each sample was presented in three biological replicates with 1 individual per replicate. Then, after RNA extraction and cDNA syntesis we assessed the expression of 11 TF genes using ddPCR. For almost all genes, the expression level was confirmed, as estimated previously by analysis of the sequencing results. However, some genes stand out strongly against the general background with a very high level of expression on the 5th day of regeneration. These are genes such as *ef-egr*, *ef-snai2*, *ef-id* and *ef-pcgf2*. Interestingly, these genes are involved in many biological processes found as a result of transcriptome analysis, and often in the same processes. Based on the enrichment analysis of processes in Cytoscape tool, processes with these genes are clustered together due to the fact that many of the genes involved in them overlap. The results of whole mount in situ hybridization (WMISH) also confirm the active participation of these genes in gut regeneration and, in particular, transdifferentiation. On the histological sections the expression of this genes strongly mark the transdifferentiating cells, but also, for some genes, cells of intestinal epithelium after transdifferentiated on 10th day of regeneration, which shows their participation not only in transdifferentiation itself, but also in the further differentiation of newly formed epithelial cells.

Thus, we have reduced the list of transdifferentiation regulators, which, in the future, will help us prove their key role in the process and understand the mechanism of effective regeneration in sea cucumbers.

References

1. Boyko A. V., Girich A. S., Tkacheva E. S., Dolmatov I. Y. The Eupentacta fraudatrix transcriptome provides insights into regulation of cell transdifferentiation // Scientific Reports. 2020. Vol. 10(1).

© A. V. Boyko, I. Yu. Dolmatov, 2021

МЕЖСАЙТОВАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

О. В. Будячок, И. А. Цыденова, М. М. Цыганов, В. А. Маркович, М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, К. А. Гаптулбарова, С. А. Тузиков, Н. В. Литвяков

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

E-mail: olya.budyachok@mail.ru

Аннотация

Считается, что внутриопухолевая гетерогенность является основной причиной неэффективности лечения операбельных опухолей различных локализаций, в том числе и рака желудка. В тоже время, помимо широко известной внутриопухолевой гетерогенности, для метастатических опухолей характерна гетерогенность между первичной опухолью и метастазами. Этот тип гетерогенности выходит на первый план при лечении первично-метастатических форм опухоли и является важной причиной низкой эффективности их лечения, поскольку, даже при персонализированном подходе, оказывается довольно сложно подобрать схему терапии, которая была бы эффективна и для лечения первичной опухоли и метастазов. Целью данной работы является изучение межсайтовой гетерогенности экспрессии генов ABC-транспортеров и генов химиочувствительности у больных раком желудка.

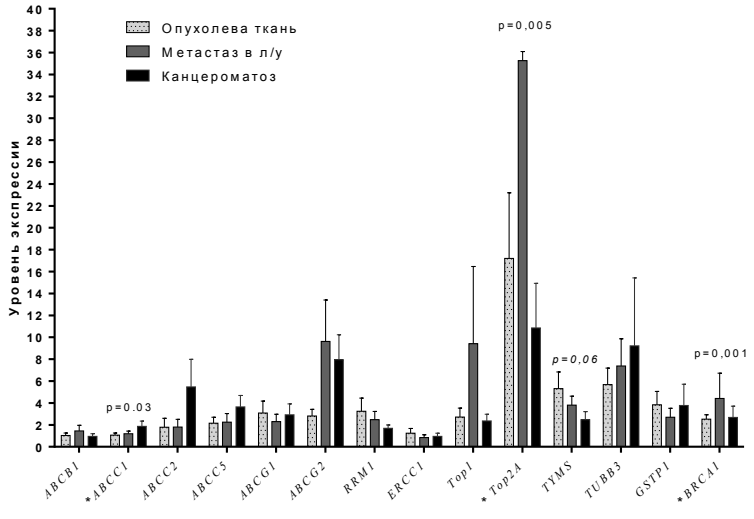
Материалы и методы

В исследование включен 41 больной с диссеминированным раком желудка IV стадий с канцероматозом брюшины. Для исследования был использован операционный материал (опухолевая ткань желудка, неизмененная ткань желудка, канцероматоз, материал метастаза в лимфатический узел, ~30–60 мм^3), который помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA).

РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии генов ABC-транспортеров: *ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC5, ABCG1, ABCG2*, и генов химиочувствительности: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS, GSTP1* оценивали при помощи обратно-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0» (StatSoft Inc., USA).

Результаты

В результате проведенного исследования был проанализирован уровень экспрессии. Для генов ABC-транспортеров наибольшее значение экспрессии характерно для генов *ABCG1*, *ABCG2, ABCG2,* соответственно для опухолевой ткани желудка, канцероматоза и метастаза в л/у. Гиперэкспрессия среди генов химиочувствительности во всех трех точках была характерна только для *Top2A*. Сравнение экспрессии между исследуемыми точками материала для каждого пациента показали статистически значимые различия в уровне экспрессии генов *ABCC1*, *Top2A* и *BRCA1* (см. рисунок).



Сравнение уровня экспрессии исследуемых генов. Звездой обозначены гены, уровень экспрессии которых статистически значимо отличается в исследуемых образцах

Установлено, что уровень экспрессии генов *Top2A* и *BRCA1* выше в метастазе в лимфатическом узле, по сравнению с опухолевой тканью желудка

© О. В. Будячок, И. А. Цыденова, М. М. Цыганов, В. А. Маркович, М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, К. А. Гаптулбарова, С. А. Тузиков, Н. В. Литвяков, 2021

и канцероматозом (при p = 0,005 и p = 0,001). Тогда как экспрессия гена *ABCC1* статистически значимо выше в канцероматозе (p = 0,03).

Заключение

Таким образом, при раке желудка наблюдается высокий уровень экспрессионной гетерогенности. Внутриопухолевая гетерогенность при разных локализациях влияет на паттерны экспрессии различных генов, при этом профиль экспрессии может быть использован для определения уровня гетерогенности.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОМА МОКРОТЫ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПОДТИПАМИ РАКА ЛЕГКОГО *

В. Ю. Буслаев[1], М. А. Винокуров[2]

[1] *Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, Кемерово*
[2] *Кемеровский государственный университет*

E-mail: michaelvinockurov@yandex.ru

Аннотация

Микробиом представляет собой совокупность сообществ бактерий, вирусов и грибов, населяющих определенный биотоп в составе организма человека. В настоящее время множество исследований направлено на изучение роли данного компонента в развитии некоторых заболеваний человека. Наибольший интерес в данном случае представляют собой онкологические патологии легочной системы.

Введение

По оценкам GLOBOCAN рак легкого (РЛ) является самым смертоносным видом рака в мире, и вторым по встречаемости, после рака груди [1]. Последние исследования показывают, что некоторые микроорганизмы и дисбактериоз микробиоты ассоциированы с развитием рака легкого [2]. Небольшое количество научных публикаций рассматривают взаимосвязь различных гистологических подтипов опухоли и определенных таксонов.

Целью данного исследования было выявление корреляции между таксономическим составом микробиома и гистологическим подтипом РЛ (плоскоклеточный РЛ и аденокарцинома).

Материалы и методы

Были взяты образцы мокроты у 18 больных аденокарциномой легкого и 26 больных с плоскоклеточным РЛ.

На первоначальном этапе производилось выделение бактериальной ДНК из образцов с применением коммерческих наборов FastDNA Spin Kit For Soil (MP Biomedicals). Метагеномный анализ проводился путем секвенирования V3–V4 вариабельных участков генов 16S рРНК с использованием технологии MiSeq Illumina. На предварительном этапе проводилось приготовление материала для секвенирования с помощью реакций ПЦР с баркодированными праймерами. Программное обеспечение QIIME2 (Quantative Insights Into Microbial Ecology 2) применялось для аннотации секвенирования и получения таксономической характеристики образцов. В качестве баз данных прокариотических нуклеотидных последовательностей использовались ресурсы SILVA и Green-Genes. Далее была выполнена статистическая оценка различий между группами пациентов с плоскоклеточным РЛ и аденокарциномой легкого с помощью U-критерия в программе Statsoft STATISTICA 10.0.

Результаты

После оценки ассоциаций различных таксонов с определенным гистологическим подтипом опухоли обнаружен бактериальный род Haemophilus, который ассоциирован с плоскоклеточным РЛ в большей степени, чем с аденокарциномой (см. таблицу).

Таксон	Пациенты с аденокарциномой, (%)	Пациенты с плоскоклеточным раком легкого,(%)	p-value
Haemophilus	0,12 ± 0,50	0,50 ± 0,83	0,013

Примечание: в таблице приведены средние показатели процентного содержания бактериальных таксонов, характеризующихся статистически значимыми различиями между двумя независимыми группами сравнения ($p < 0,05$).

Обсуждение

Была обнаружена достоверная статистическая связь между таксоном Haemophilus и плосклеточным РЛ. Ранее было показано, что представители данного бактериального таксона присутствуют в микробиоме у пациентов с плоскоклеточным РЛ, но ассоциаций с конкретным гистологическим подтипом опухоли найдено не было [3], а также с хронической обструктивной болезнью легких [4]. В дальнейшей перспективе для уточнения резуль-

© В. Ю. Буслаев, М. А. Винокуров, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 20-44-420012 р-а.

татов этого исследования планируется выполнить сиквенс микробиома с помощью нанопорового секвенатора MinION Oxford Nanopore.

Литература

1. Ferlay J., Ervik M., Lam F. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.fr/today, accessed [19.04.2021]

2. Mao Q., Jiang F., Yin R., Wang J. et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer // Cancer Lett. 2018. Vol. 28. No 415. P. 40–48.

3. Laroumagne S., Lepage B., Hermant C. et al. Bronchial colonisation in patients with lung cancer: a prospective study // Eur Respir J. 2013. Vol. 42(1). P. 220–9.

4. Moghaddam S. J., Ochoa C. E., Sethi S., Dickey B. F. Nontypeable Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2011. Vol. 6. P. 113–123.

ПОИСК ПОДХОДОВ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОФИБРОМАТОЗОВ НА ОСНОВАНИИ ПЕРЕСТРОЙКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 1 И 2 ТИПА

П. А. Волковинская, Д. С. Степанова, Л. А. Браун, А. А. Дьячкова,
Ф. В. Куликов, Э. Э. Варпетян, Н. Л. Шимановский

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

E-mail: polinavolkovinskaya@gmail.com

Аннотация

Нейрофиброматозы — группа редких наследственных заболеваний, относящихся к факоматозам. Наиболее распространены нейрофиброматозы I и II типа, которые наследуются по аутосомно-доминантному типу и характеризуются формированием доброкачественных опухолей, чаще всего шванном и менингиом в центральной нервной системе и по ходу периферических нервов. Больные нейрофиброматозом должны постоянно подвергаться хирургическим вмешательствам, так как специфической фармакотерапии для нейрофиброматоза пока не существует. Установлено, что фактором, обуславливающим развитие опухолей, являются инактивирующие мутации в генах *NF1* и *NF2*, но молекулярные основы опухолевой трансформации до сих пор не известны.

Целью этой работы является поиск возможных мишеней для таргетной терапии нейрофиброматозов путем анализа метаболических изменений опухолевых клеток, ассоциированных с нейрофиброматозами I и II типов.

Работа была выполнена на следующих клеточных линиях:

MEF $NF2^{flox/flox}$ — мышиные эмбриональные фибробласты, нормальные по гену NF2;

MEF $NF2^{-/-}$ — мышиные эмбриональные фибробласты, нокаутные по гену NF2;

Hei193 — человеческая шваннома с мутированной формой мерлина;

Aco7 — нормальные арахноидальные клетки человека;

90-8, 88-3, ST 88-14 — NF1-ассоциированные клетки злокачественной опухоли влагалища периферического нерва.

Для NF2-отрицательных и контрольных клеточных линий было проведено метаболическое профилирование методом ВЭЖХ или ГХ с тандемной масс-спектрометрией. В NF2-отрицательных клетках замечено изменение метаболического профиля, а именно, повышение уровня метаболитов глутаминолиза и цикла Кребса и уровня жирных кислот. Было обнаружено повышение уровня экспрессии белков, принимающих участие в липогенезе.

Далее была проведена оценка действия на опухолевые клетки ингибитора синтазы жирных кислот церуленина. По сравнению с нормальными клетками NF2-отрицательные клетки показали более высокую чувствительность (EC_{50} для опухолевых клеток была ниже примерно в 2,5 раза). Ранее мы показали, что церуленин запускает апоптоз, так как вызывает накопление в клетке малонил-КоА. Поэтому мы выполнили серию экспериментов с добавлением модуляторов метаболических ферментов, повышающих уровень малонил-КоА с целью увеличения чувствительности NF2-отрицательных клеток к церуленину. Были исследованы ингибитор киназы пируватдегидрогеназы — дихлорацетат натрия и ингибитор малонил-КоА декарбоксилазы — CBM 3001106. Оба соединения приводили к значительному понижению EC_{50} опухолевых клеток.

Помимо этого, для NF1-отрицательных клеток также были построены кривые «доза/эффект» для оценки чувствительности к церуленину. Полученные данные показывают, что они более чувствительны к церуленину, чем контрольные клеточные линии.

В дальнейшем, мы надеемся найти общий подход для лечения нейрофиброматозов обоих типов.

Выводы

1. Обнаружена перестройка метаболического профиля у *NF*-отрицательных клеток: определено повышение уровня метаболитов глутаминолиза, уровня жирных кислот и метаболитов цикла лимонной кислоты.

2. *NF2* и *NF1*-отрицательные клеточные линии показали более высокую чувствительность к воздействию ингибиторов синтазы жирных кислот, по сравнению с контролем.

3. Чувствительность *NF2*-отрицательных клеток усиливает добавление модуляторов метаболических ферментов: ингибитора киназы пируватдегидрогеназы — дихлорацетата натрия и ингибитора малонил-КоА декарбоксилазы — CBM 3001106.

© П. А. Волковинская, Д. С. Степанова, Л. А. Браун, А. А. Дьячкова, Ф. В. Куликов, Э. Э. Варпетян, Н. Л. Шимановский, 2021

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕРМИНАЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Т. С. Геращенко[1], А. А. Хозяинова[1], Р. С. Воробьев[1], А. А. Щеголева[1], Е. О. Родионов[1], А. М. Киселев[2], Н. Н. Артемов[3], О. В. Панкова[1], В. М. Перельмутер[1], Е. В. Денисов[1]

[1] *НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, Томск*
[2] *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*
[3] *Broad institute, Кембридж, США*

E-mail: t_gerashenko@list.ru

Аннотация

Гематогенное метастазирование является основной причиной смертности пациентов с раком легкого. В работе проведено генотипирование пациентов с немелкоклеточным раком легкого с целью поиска герминальных структурных вариантов ДНК, предрасполагающих к гематогенному метастазированию.

Актуальность

Профилактика и раннее обнаружение отдаленных метастазов немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) является актуальной проблемой современной онкологии. Известно, что формированию НМРЛ предшествуют предопухолевые изменения бронхолегочного эпителия, протекающие на фоне хронического воспалительного процесса: базальноклеточная гиперплазия (БКГ), плоскоклеточная метаплазия и дисплазия I–III степеней [1]. Ранее показано, что наличие БКГ в эпителии мелких бронхов у больных НМРЛ в отдалении от опухолевого очага увеличивает риск развития гематогенного метастазирования [2]. Весьма вероятно, такие морфологические изменения могут являться косвенным отражением системных иммуновоспалительных процессов, которые способствуют прогрессированию НМРЛ.

Цель

Идентификация вариаций числа копий ДНК (CNV), ассоциированных с высоким риском гематогенного метастазирования НМРЛ.

Материалы и методы

В исследование был включен 71 пациент (58,7 ± 8,9 лет) с НМРЛ ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$): пациенты с наличием БКГ ($n = 46$) и отсутствием морфологических изменений ($n = 25$). ДНК была выделена из образцов периферической крови фенол-хлороформным методом. Секвенирование проводилось на платформе NextSeq 500 (Illumina, США) с предварительной подготовкой библиотек набором SureSelect XT Human All Exon v.7 (Agilent, США). Биоинформатический анализ данных секвенирования выполнялся с помощью пайплайна GATK и инструмента ClinCNV.

Результаты

Для поиска CNVs, ассоциированных с высоким риском метастазирования, были выбраны регионы, представленные только у больных с БКГ по сравнению с пациентами с нормальным эпителием. Так, у пациентов с БКГ обнаружено 12 регионов с измененной копийностью, затрагивающих хромосомы 1, 2, 7, 8, 10, 11, 17, 19, 20 и 21. В 88 % случаев структурные вариации представлены делециями хромосомных регионов, в 12 % — амплификациями. Частота обнаруженных CNVs варьирует от 0,04 до 0,39, средний размер региона составляет 11,3 ± 8,9 Mb. Функциональное аннотирование генов, затронутых CNV, показало их вовлеченность в регуляцию транскрипции, иммунных реакций и метаболизма.

Вывод

Высокий риск гематогенного метастазирования НМРЛ ассоциирован с CNVs в генах, вовлеченных в регуляцию транскрипции, иммунных реакций и метаболизма.

Литература

1. Denisov E. V. et al. Premalignant lesions of squamous cell carcinoma of the lung: The molecular make-up and factors affecting their progression // Lung Cancer. 2019. Vol. 135. P. 21–28.

2. Панкова О. В. Морфофункциональные особенности респираторного эпителия при немелкоклеточном раке легкого и хроническом воспалении и их связь с прогрессией опухолевого и предопухолевых процессов: дис. …. д-ра биол. наук. Санкт-Петербург, 2017. 288 с.

© Т. С. Геращенко, А. А. Хозяинова, Р. С. Воробьев, А. А. Щеголева, Е. О. Родионов, А. М. Киселев, Н. Н. Артемов, О. В. Панкова, В. М. Перельмутер, Е. В. Денисов, 2021

ВЕКТОР РАСПРОСТРАНЕНИЯ БЫЧКА-ПЕСОЧНИКА (*NEOGOBIUS FLUVIATILIS* (PALLAS, 1814)) В БЕЛОРУССКУЮ ЧАСТЬ ЦЕНТРАЛЬНОГО ИНВАЗИОННОГО КОРИДОРА НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ*

В. И. Головенчик, Е. С. Гайдученко, Т. П. Липинская

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск

E-mail: vika.golovenchik@mail.ru

Аннотация

В работе представлены данные об уровне генетической вариабельности в нативных и чужеродных популяциях бычка-песочника. Полученные в ходе исследования данные, дают возможность предположить, что вселение бычка-песочника произошло путем интродукции небольшого числа особей еще до строительства каскада водохранилищ на Днепре.

Процессы биологических инвазий являются уникальным объектом для анализа микроэволюционных процессов, происходящих при заселении видами новых территорий. При этом изучение и сравнение уровня генетической вариабельности в аборигенных и чужеродных популяциях позволяет определять и уточнять пути и способы проникновения видов на новую территорию. Это два важнейших критерия, которые позволяют прогнозировать дальнейшее распространение инвайдеров, разрабатывать мероприятия по упреждению инвазивных угроз и сохранять аборигенные виды животных. В настоящее время Понто-Каспийский регион стал мощным источником инвазий в воды Балтийского и Северного морей. Расселение видов происходит по так называемым инвазионным коридорам: Южному, Центральному и Северному, но вопрос о способах расселения все еще остается открытым. Целью данной работы было определить возможные способы распространения инвазивного вида рыб бычка-песочника (*Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814) через Центральный инвазионный коридор на основании анализа уровня генетического разнообразия в аборигенных и чужеродных популяциях.

В качестве материала для данного исследования были использованы 74 последовательности гена COI, 40 последовательностей гена *cyt b* и 27 последовательностей интрона 1 гена S7 бычка-песочника полученные авторами работы для Центрального инвазионного коридора выше Киевского водохранилища, а также последовательности представленные в Международных базах данных. Методику выделения ДНК адаптировали для работы с образцами тканей рыб. Целевые фрагменты молекулярных маркеров были получены с использованием праймеров разработанных для семейства Бычковые. Для статистического анализа данных использовали программы Mega 7 и DnaSP5.

Всего, в ходе анализа, было обнаружено 14 гаплотипов гена *cyt b* (2 в Центральном инвазионном коридоре), 5 гаплотипов гена COI (2 в Центральном инвазионном коридоре) и 5 гаплотипов интрона 1 гена S7 (2 в Центральном инвазионном коридоре). Сравнение генетического разнообразия показало, что образцы из Центрального инвазионного коридора, характеризуются крайне низким гаплотипическим разнообразием. Наиболее информативен оказался ген *cyt b*, так в нативном ареале (Черное море и лиманы) данный показатель был равен 0,9, а в Центральном инвазионном коридоре — 0,04, для сравнения в Южном инвазионном коридоре (р. Дунай, р. Рейн) данный показатель был такой же как в нативном ареале — 0,9. Анализ других генов показывает схожий результат, однако они оказались менее информативны. Рассматриваемая область Центрального инвазионного коридора практически полностью занята одним гаплотипом «Нар_1» гена *cyt b*, который также широко представлен в Черном море и лиманах, а на медианной сети гаплотипов занимает базальное положение по отношению к большинству остальных. Гаплотипы двух других маркеров, обнаруженные в Центральном инвазионном коридоре, больше нигде найдены не были.

Полученные результаты вместе с анализом исторических данных о судоходстве на р. Днепр позволяют предположить, что проникновение бычка-песочника в Белорусскую часть центрального инвазионного коридора произошло путем случайной интродукции еще до строительства каскада водохранилищ на Днепре, а не путем самостоятельного расселения, как считалось ранее.

© В. И. Головенчик, Е. С. Гайдученко, Т. П. Липинская, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта БРФФИ Б20М-040.

НОКДАУН ГЕНА *CC2D1A* В ГИППОКАМПЕ: ЭФФЕКТ НА ПОВЕДЕНИЕ И СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ ASC (ANTIDEPRESSANTS SENSITIVE CATALEPSY) С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ*

Ю. Д. Григорьева, Е. М. Кондаурова, Т. В. Ильчибаева, Д. В. Еремин. Д. В. Базовкина, В. С. Науменко

Федеральный Исследовательский Центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: grigorevaulia465@gmail.com

Аннотация

Важнейший нейромедиатор мозга серотонин (5-НТ) играет значительную роль в регуляции такого психического расстройства, как депрессия. 5-НТ1А серотониновый рецептор является одним из наиболее важных и широко распространенных рецепторов 5-НТ-системы головного мозга, играющий значимую роль в модуляции эмоций и поведения. Известно, что ген рецептора 5-НТ1А (*Htr1a*) находится под контролем транскрипционного фактора Freud-1. Здесь мы исследовали влияние экспериментального подавления экспрессии гена, кодирующего транскрипционный фактор Freud-1, *Cc2d1a* (с использованием аденоассоциированных вирусных конструкций *in vivo*) в гиппокампе на поведение и серотониновую систему мозга мышей линии ASC.

Показано, что введение вирусного конструкта приводит к снижению уровня мРНК гена *Cc2d1a* ($p < 0.05$) в гиппокампе по сравнению с контрольным. Функциональная активность 5-НТ1А рецептора достоверно увеличилась ($p < 0,5$) у мышей опытной группы. Уровень мРНК гена *Htr1a* снизился ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным. С другой стороны, уровень мРНК гена *Htr2a* не был достоверно изменен, но функциональная активность 5-НТ2А рецептора снизилась ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным. На ряду с этим, было показано снижение уровня мРНК генов, кодирующих такие транскрипционные факторы, как HES5 ($p < 0,05$), но не DEAF1, у мышей опытной группы. Компенсаторной реакцией к снижению экспрессии гена 5-НТ1А рецептора стало повышение активности фермента ТПГ2 ($p < 0,05$) в мозге мышей опытной группы, при этом уровень мРНК гена *Tph2* не был изменен.

Введение вирусного конструкта повышало мобильность в тесте «принудительное плавание» ($p < 0,01$). Тесты «открытое поле» и «темная-светлая камера» не показали достоверных различий по всем параметрам. Было показано, что нокдаун гена *Cc2d1a* приводит к снижению времени неподвижности ($p < 0,05$), а также достоверно снижает процент мышей-каталептиков ($p < 0,05$).

Таким образом, нокдаун гена *Cc2d1a* в гиппокампе приводит к снижению депрессивно-подобного поведения как в классическом тесте принудительного плавания, так и в тесте на щипковую каталепсию у мышей линии ASC, сопровождающееся существенными изменениями, как в состоянии 5-НТ-системы мозга, так и в работе транскрипционных факторов *Htr1a* гена.

© Ю. Д. Григорьева, Е. М. Кондаурова, Т. В. Ильчибаева, Д. В. Еремин. Д. В. Базовкина, В. С. Науменко, 2021

* Работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00027. Животные содержались за счет средств бюджетного проекта № 0259-2021-0015. Работа реализована на оборудовании Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, при поддержке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ СЫВОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, МОДУЛИРУЮЩИХ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСВИЕ С АВ-ПЕПТИДОМ, В ЦЕЛЯХ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *

Е. И. Дерюшева, Е. А. Литус, Е. Л. Немашкалова, М. П. Шевелева, С. Е. Пермяков

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

E-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

Аннотация

Несмотря на огромные усилия по изучению болезни Альцгеймера (БА), до сих пор нет полного понимания этиологии и патогенеза заболевания, что осложняет разработку эффективных средств его профилактики и терапии. Амилоидный бета-пептид (Аβ) — один из ключевых факторов развития БА: дисбаланс между продукцией и выведением Аβ приводит к его накоплению в тканях головного мозга и образованию амилоидных бляшек. Новым перспективным подходом к патогенетической терапии БА является ускорение выведения Аβ из центральной нервной системы путем воздействия на человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), выступающего в качестве «депо» Аβ. Данный подход может быть реализован за счет увеличения сродства ЧСА к Аβ путем изменения концентрации лигандов ЧСА в крови. Разработка этого подхода требует проведения систематического поиска лигандов ЧСА и исследования их влияния на взаимодействие ЧСА с Аβ.

На основе биоинформатического анализа нами была сформирована панель низкомолекулярных лигандов ЧСА небелковой природы, ассоциированных с БА, подлежащих экспериментальному изучению на предмет их влияния на равновесие ЧСА-**Аβ**. В качестве первоначальных источников данных использовали базу данных DrugBank и онлайн-ресурс Alzforum. В качестве критериев отбора кандидатов использовали величины их растворимости в воде, концентрации в плазме крови и проницаемости через гематоэнцефалический барьер, а также ассоциацию с БА. Реализация алгоритма идентификации и извлечения данных, а также их анализа, была проведена с использованием высокоуровневого языка программирования Python 3.6. Итоговая панель кандидатов включает в себя 104 вещества, включая росиглитазон, метиленовый голубой, ибупрофен, рисперидон, некоторые витамины (А и В1), антибиотики (тетрациклин, мелоксикам, ампициллин) и гормоны (тестостерон, эстрадиол). Для оценки специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов были смоделированы трехмерные структуры комплексов ЧСА с некоторыми из кандидатов. Для ряда азотсодержащих гетероароматических соединений найдены различия в паттернах взаимодействия с ЧСА. Методом поверхностного плазмонного резонанса изучено влияние некоторых кандидатов (ибупрофен, рисперидон, триптофан, серотонин) на равновесные и кинетические параметры взаимодействия ЧСА с мономерной формой $Аβ_{40}/Аβ_{42}$, а также кинетику реакции фибриллообразования Аβ в присутствии ЧСА и его лигандов. Показано, что все кандидаты, изученные экспериментально, за исключением триптофана, усиливают сродство ЧСА к Аβ.

Таким образом, систематический поиск и экспериментальное исследование низкомолекулярных лигандов ЧСА на предмет их способности модулировать процесс образования комплекса ЧСА с Аβ, позволил найти несколько веществ, существенным образом усиливающих взаимодействие между ЧСА и Аβ. Полученные результаты могут послужить основой для разработки средств терапии и профилактики БА.

© Е. И. Дерюшева, Е. А. Литус, Е. Л. Немашкалова, М. П. Шевелева, С. Е. Пермяков, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 20-74-10072 (Е. А. Литус).

BINARY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR ONCOMARKER-DEPENDENT TARGET RNA DEGRADATION*

V. S. Drozd[1], D. D. Nedorezova[1], V. V. Smirnov[1], A. A. Eldeeb[1], D. M. Kolpashchikov[1,2]

[1] *University ITMO, International Scientific Center SCAMT*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: valeryadrozd@gmail.com

Abstract

Despite numerous medical efforts, cancer is recognized as the leading cause of death worldwide in 2021 [1]. Radiotherapy, chemotherapy and surgery remain the main strategies for cancer treating. However, side effects and chemoresistance encourage scientists to continue the search of new rational approaches to treatment [2]. Another modern alternative of existing methods is gene therapy [3]. Antisense oligonucleotides (ASO) are the most widely used mechanism for suppressing the gene of interest, which leads to decrease mRNA expression by more than 80 % [4]. Degradation of the target RNA is mediated by the activation of the endogenous enzyme RNase H as response to the formation of a duplex between the short antisense DNA fragment and the target RNA [5]. However, one of the problems of ASOs as drugs is side effects to normal tissues [4].

To partially eliminate this problem, we developed biASO, which activates the cleavage of target vital RNA (e.g. housekeeping gene mRNA) as response to the presence of oncogene overexpressed in cancer cells [6–8]. The main advantages of the biASO over other modern approaches of gene therapy (ASO, siRNA, CRISPR/Cas) is its ability to recognize cancer marker with high selectivity and trigger cell death by targeting another gene crucial for cell survival, thus promising to become highly selective and efficient cancer therapy agent. In this proof-of-the-concept study we used a fragment of KRAS RNA as a model of oncomarker and the fragment of GFP RNA as a target for optimization of biASO system.

Several biASO constructions of different designs were incubated at 37 °C for 20 min with GFP RNA and RNase H in the absence or presence of the KRAS RNA. Target RNA cleavage efficacy was quantified (fig. B). The results indicate the possibility of biASO to selectively activate the cleavage of the target RNA without losing the cleavage efficiency in comparison with the original ASO. In addition, a complete elimination of the cleavage of the target RNA in the absence of the oncomarker was achieved by changing the length of the GFP RNA-binding sites of biASO, while maintaining 65 % of the cleavage efficiency in comparison with the original ASO (fig. B — the comparison of the 2 and 8 columns). In the future, we plan to test biASO on the K562 cell line transformed with the GFP gene to assess the possibility of biASO to activate selective degradation of the GFP mRNA *in vivo*.

Binary antisense oligonucleotides: A — complex of GFP RNA (labeled with FAM from the 5 'end), biASO (ASO1 and ASO2) and KRAS RNA; B — calculated percentage of cleavage by quantifying the intensity of the bands after separation of the cleavage products by electrophoresis; C — the results of electrophoresis in 15 % denaturing PAGE (black arrow indicates the original GFP RNA; only 5'-cleavage products are visible)

The new technology solves the issues of selectivity of the ASO technology in relation to normal and tumor cells. If successful, biASO will allow gene therapy technologies to reach a new level of their development in medicine.

References

1. World Health Organization. Fact sheets, Cancer. Updated 3rd March 2021.
2. Abdullah L. N. et al. // Clin Trans Med 2. 2013. Vol. 3.
3. Roma-Rodrigues C. et al. // Pharmaceutics. 2020. Vol. 12 (3). P. 233.
4. Kher G., Trehan S., Misra A. // Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics. 2011. P. 325–386.
5. Carter G., Lemoine N. // Br J Cancer. 1993. Vol. 67. P. 869–876.
6. Kamphues C. et al. // J Surg Oncol. 2021. Vol. 123 (4). P. 1005–1014.
7. Nedorezova D. D. et al. // ChemBioChem, 2020. Vol. 21. P. 607–611.
8. Nedorezova D. D. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2019. Vol. 58. P. 4654–4658.

© V. S. Drozd, D. D. Nedorezova, V. V. Smirnov, A. A. Eldeeb, D. M. Kolpashchikov, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90071.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ И ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНОЙ ЗНАЧИМОСТИ TGFB-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ У ПАЦИЕНТОК С ДИАГНОЗОМ ER-ПОЗИТИВНЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАВШИХ ТАМОКСИФЕН

Т. А. Дронова[1], Н. Н. Бабышкина[1,2], Е. М. Слонимская[3], Н. В. Чердынцева[1]

[1] НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
[2] Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск
[3] Санкт-Петербургский государственный университет

E-mail: tanyadronova@mail.ru

Аннотация

Изменение активности TGFβ — ассоциированных белков играет важную роль в формировании эндокринной чувствительности. Цель исследования — изучение взаимосвязи между уровнем генной и белковой экспрессии TGFβ1, TGFβR1, TGFβR2, циклина D1, а также их полиморфных локусов с прогнозом и эффективностью лечения тамоксифеном у больных ER — позитивным раком молочной железы (РМЖ). Полученные данные указывают на то, что транскрипционная активность и экспрессия белковых продуктов исследуемых маркеров могут выступать в качестве потенциальных молекулярных факторов устойчивости к проводимой гормонотерапии.

Актуальность

TGFβ1 является одним из наиболее значимых тканевых ростовых факторов, а изменение функциональной активности классического TGFβ1/SMAD сигнального каскада может приводить к интенсивной пролиферации клеток, в том числе за счет увеличения продукции регуляторных молекул клеточного цикла, таких как циклин D1 [1].

Цель

Изучить взаимосвязь TGFβ — ассоциированных белков и белка циклина D1 с прогнозом и эффективностью терапии тамоксифеном среди пациенток с ER –позитивным РМЖ.

Материалы и методы

В качестве объектов для исследования был взят 141 образец опухолевой и прилежащей нормальной ткани РМЖ. Уровень генной экспрессии *TGF*β1, *TGF*βR1, *TGF*βR2 и *CCND1*, а также генотипирование *TGF*β1 (rs1800469, rs1800470), *TGF*βR1 (rs334354), *TGF*βR2 (rs2228048) и *CCND1* (rs678653) было изучено при помощи методики ПЦР в режиме реального времени. Фенотипирование клеток, экспрессирующих TGFβ1, TGFβR1, TGFβR2 и циклин D1 проведено при помощи проточной цитофлуориметрии. Для оценки прогностической значимости исследуемых маркеров проведен анализ безрецидивной выживаемости.

Результаты

На основании отдаленных результатов лечения все пациентки были разделены на две группы: тамоксифен-чувствительную (ТЧ) — 110 женщин, тамоксифен-резистентную группу (ТР) — 31 женщина. Было показано, что с неэффективным ответом на гормональную терапию ассоциирован высокий уровень транскрипционной активности гена *TGF*β1 ($p = 0,025$). Напротив, высокий уровень мРНК гена *TGFβR2* был значимо выше в тамоксифен-чувствительной группе больных ($p = 0,024$). Показано, что тамоксифен-чувствительные опухоли характеризуются высоким содержанием белковых продуктов TGFβR1 ($p = 0,030$). Выявлен высокий процент $TGF\beta R2^+$ клеток среди пациенток, имеющих благоприятное течение заболевания ($p = 0,073$). В ходе исследования была также изучена экспрессия субпопуляций опухолевых клеток, несущих различные комбинации интересующих нас маркеров. Так было установлено, что в опухолях, чувствительных к тамоксифену, уровень экспрессии субпопуляции циклин $D1^-/TGF\beta R2^+$ выше, по сравнению с опухолями, резистентными к данному лечению ($p = 0,009$). При сравнении показателей безрецидивной выживаемости показано увеличение времени до прогрессирования заболевания среди пациенток, имеющих высокий процент белка TGFβR2 в опухоли (log rank $p = 0,011$). Низкие показатели безрецидивной выживаемости были ассоциированы с высоким уровнем экспрессии внутриклеточного белка циклина D1, однако результаты не достигали статистической значимости (log rank $p = 0,079$).

© Т. А. Дронова, Н. Н. Бабышкина, Е. М. Слонимская, Н. В. Чердынцева, 2021

Выводы

Представленные результаты позволяют рассматривать TGFβ — ассоциированные белки, а также внутриклеточный белок циклин D1 в качестве прогностических и предсказательных маркеров ответа на гормональную терапию тамоксифеном.

Литература

Akhurst R. J. TGF beta signaling in health and disease // Nat Genet. 2004. Vol. 36. P. 790–792.

RNA-CLEAVING BIVALENT DNA-DEVICES FOR INHIBITION OF GENE EXPRESSION

M. V. Dubovichenko[1], G. A. Bobkov[1], M. Batsa[1], D. M. Kolpashchikov[1,2]

[1] *SCAMT Laboratory, ITMO University, Russia*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: dubovichenko@scamt-itmo.ru

Abstract

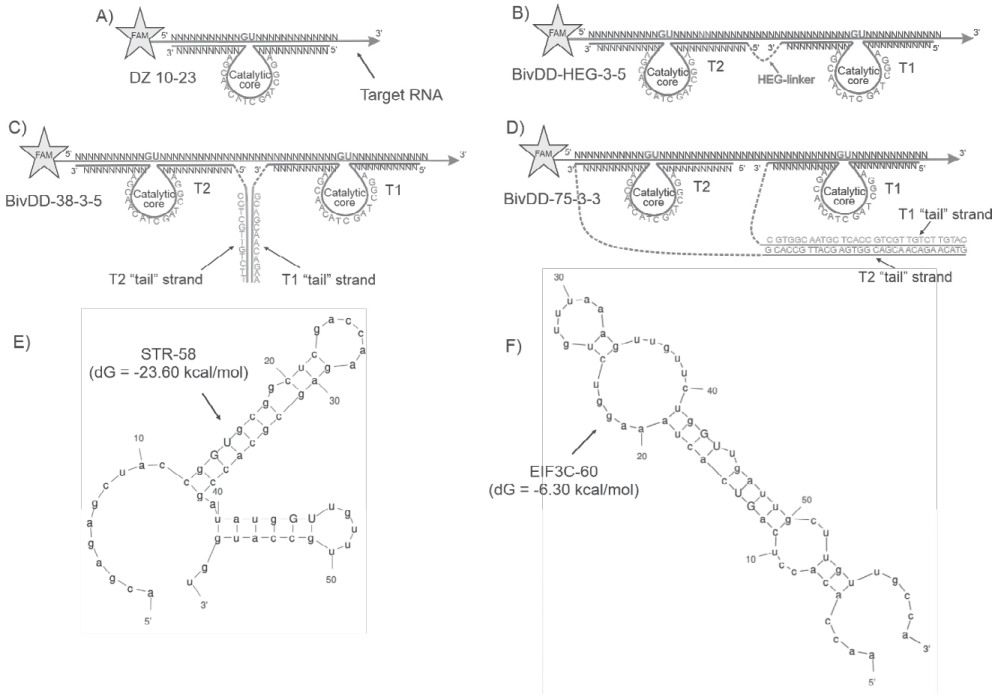
We developed DNAzyme-based bivalent DNA-devices (BivDDs) capable of significantly better cleaving target RNA in a folded secondary structure than single DNAzymes. The improved efficiency is due to the cooperative action of two RNA cleaving subunits in a single DNA-device.

Gene silencing is a promising method for treating diseases, specifically knockdown of genes responsible for pathogenic processes. Nowadays, the gene silencing method has gained great popularity in research aimed at treating genetic, neurological and cancer diseases [1].

Therapeutic oligonucleotides (TONs), such as small interference RNA (siRNA), antisense oligonucleotides (ASO) and DNAzymes, are used as knockdown agents. In modern studies, all three of the above methods have demonstrated effective inhibition of target genes [2, 3]. However, TONs have common disadvantage of TONs such as the secondary structure of RNA, that significantly decrease affinity [1]. Modern solutions of problems includes computer screening of target RNA sites, multicomponent DNA-machines with additional RNA unwinding «arms» and chemical modifications of TONs [1, 4].

In our work, we developed RNA-cleaving bivalent DNA devices (BivDDs), made of two subunits based on DNAzymes, enclosed in one molecule. We believe that the use of two DNAzymes in one molecule can increase the affinity and increase the overall catalytic cleavage of highly folded RNA targets. We have developed three variants of such devices, differing in the way two subunits are associated with each other: BivDD-38-3-5, BivDD-75-3-3, BivDD-HEG-3-5 (see figure).

We compared the catalytic activity between BivDD devices and simple DNAzymes with two target RNA fragments with different folding energies: the more stable is STR-58 (dG = −23,60 kcal/mol) and the less stable is EIF3C-60 (dG = −6,30 kcal/mol) (figure F, G). The experiments were carried out in a near-physiological solution (50 mM KCl, 50 mM HEPES, 15 mM NaCl, 2 mM MgCl2, pH = 7,4). Under single-turnover conditions with STR-58 and EIF3C-60 targets, the best BivDD-38-3-5 and BivDD-HEG-3-5 devices demonstrated 1543 and 1879 and 82 and 92 % increase in



The design of Biv-DDs and RNA targets: A — DNAzyme 10-23 (control); B — BivDD-HEG-3-5; C — BivDD-38-3-5; D — BivDD-75-3-3; E — RNA fragment STR-58; F — RNA fragment EIF3C-60

© M. V. Dubovichenko, G. A. Bobkov, M. Batsa, D. M. Kolpashchikov, 2021

cleavage compared to Dz1. Under multiple-turnover conditions (100 and 10 nM cleavage agents; 1 μM RNA-target) with an STR-58 target, the BivDD-38-3-5 and BivDD-HEG-3-5 devices showed 501 and 1268 % increase in cleavage compared to with Dz1. However, none of the BivDDs targeting EIF3C-60 showed an increase in comparison with Dz1 cleavage. Dz1 outperformed the best DNA-device BivDD-75-3-3 in cleavage by 17 %. The data obtained indicate that bivalent DNA devices based on DNAzymes associate with highly stable target RNA and cleave it significantly better in comparison with single DNAzymes. However, if the target is less stable, bivalent devices do not show significant superiority over single DNAzymes. The hypothesis requires further confirmation using BivDDs with different approaches of RNA-cleaving subunits associations as well as use BivDDs inside cells for gene knockdown *in vivo*.

References

1. Levin A. A. Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides // N. Engl. J. Med. 2019. Vol. 380. № 1. P. 57–70.

2. Bennett C. F. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age // Annu. Rev. Med. 2019. Vol. 70. P. 307–321.

3. Wang Y. et al. A biologically stable DNAzyme that efficiently silences gene expression in cells // Nat. Chem. Springer US, 2021. Vol. 13. № 4. P. 319–326.

4. Nedorezova D. D. et al. Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy // ChemBioChem. 2020. Vol. 21. № 5. P. 607–611.

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПОЛИМЕРНЫМИ И ТИТАНОВЫМИ МАТЕРИАЛАМИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТОВ

А. С. Дуденкова, Л. Н. Комарова, Е. Р. Ляпунова

Обнинский институт атомной энергетики —
филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ

E-mail: erlyapunova@oiate.ru

Аннотация

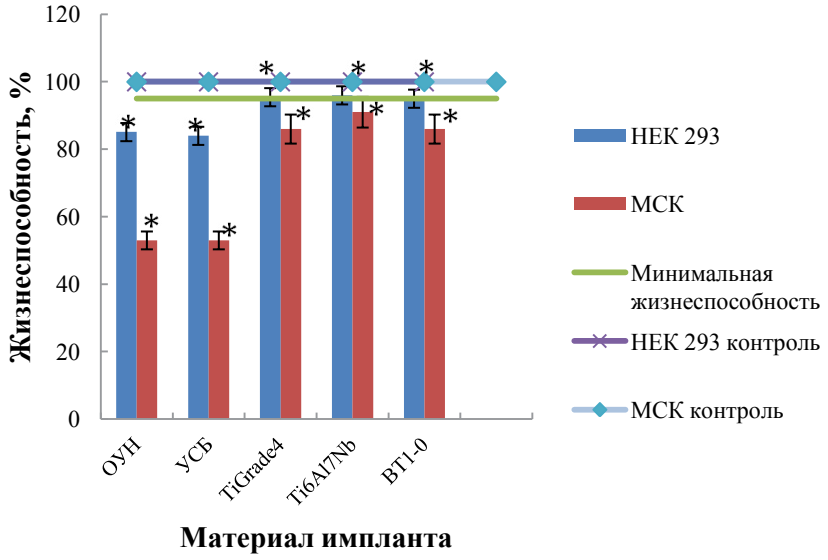
В работе представлены результаты анализа биологической совместимости материалов для медицинских имплантов с различной обработкой поверхности при культивировании с мезенхимальными стволовыми клетками плаценты и клеточной линией НЕК-293.

Используемые для медицинских имплантов материалы не должны оказывать на организм токсического, иммуногенного и канцерогенного эффекта, обязаны не нарушать нормальную работу тканей и органов и сохранять свои характеристики на протяжении всего срока службы, т. е. быть биологически совместимы. Поэтому каждый потенциально новый материал для их изготовления проходит через ряд испытаний, оценки его биологической совместимости [3].

В данной работе были исследованы материалы двух видов: полимерные и титановые. В качестве полимерных материалов были выбраны образцы на основе пиролитического углерода (УСБ) и объемного углеродного наностурктурированного материала (ОУН), титановые образцы включали в себя сплав TiGrade4, сплав титана, алюминия и ниобия (Ti6Al7Nb) и «чистый» титан (ВТ). Образцы из сплавов были модифицированы покрытием анатаз, «чистый» титан обработан при помощи галтовки.

Используемые в работе клетки — линии НЕК-293 и мезенхимальные стволовые клетки (МСК) плаценты — культивировали по стандартной методике. Клеточные суспензии в концентрации 50 000 кл/мл разливали в шестилуночные планшеты, в лунках которых находились исследуемые образцы материалов, простерилизованные в сухожаровом шкафу. На третьи сутки образцы осторожно извлекались из лунок пинцетом. Жизнеспособность определялась окрашиванием клеток селективным красителем.

На рисунке представлено изменение жизнеспособности при культивировании клеток двух линий с тестируемыми образцами материалов.



Изменение жизнеспособности НЕК-293 и МСК плаценты в зависимости от тестируемого материала,
* — различия значимы при $p < 0{,}05$

© А. С. Дуденкова, Л. Н. Комарова, Е. Р. Ляпунова, 2021

Минимально допустимый уровень жизнеспособных клеток должен составлять 95 %. Из рисунка видно, что данное значение получено только при культивации клеток линии HEK-293 с образцами из титана. В остальных случаях процент жизнеспособности ниже минимума.

Полученные данные позволяют предположить, что материалы оказывают влияние на клетки. Известно свойство металлических материалов для имплантов вызывать в тканях стресс из-за отсутствия биологического разложения [1]. На биологическую совместимость может влиять и покрытие импланта [2].

Титановые сплавы Grade 4 и Ti6Al7Nb покрыты анатазом. Это диоксид титана в форме кристалла с тетрагональной сингонией. Есть данные [4] о токсичном влиянии этого соединения на многоклеточные организмы.

Материал для медицинских имплантов не должен вызывать гибель клеток. Из результатов следует, что выбранные материалы требуется доработать, чтобы повысить их биологическую совместимость. В нынешнем виде использование их для получения медицинских имплантов не желательно.

Литература

1. Власова Т. И. и др. Современный взгляд на использование костных заменителей и возможность усиления их остеогенности клеточными технологиями // Медицинский вестник Башкортостана. 2020. Т. 15. № 2(86). С. 53–58.

2. Макарова Э. Б. и др. Интеграция костной ткани в пористые титановые импланты с алмазоподобными нанопокрытиями // Гений ортопедии. 2011. № 4. С. 111–116.

3. Рожнова О. М. и др. Биологическая совместимость медицинских изделий на основе металлов, причины формирования патологической реактивности // Бюллетень сибирской медицины. 2015. Т. 14. № 4. С. 110–118.

4. Шейда *Е.* В. и др. Влияние ультрадисперсных частиц Ti и TiO_2 на физиологический статус и состояние центральной нервной системы животных // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2018. № 4. С. 232–235.

АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ

А. А. Дьячкова, Д. С. Степанова, Л. А. Браун,
П. А. Волковинская, Ф. В. Куликов, Э. Э. Варпетян, Н. Л. Шимановский

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

E-mail: dyachkova.anya@list.ru

Аннотация

Нейрофиброматозы (НФ) — это группа генетических заболеваний, при которых носители генетического дефекта подвержены развитию доброкачественных и злокачественных опухолей нервной системы. Существует три типа нейрофиброматозов: нейрофиброматоз I типа (НФ1), II типа (НФ2) и шванноматоз. Одним из перспективных направлений поиска фармакотерапии является изучение возможности воздействия на метаболизм. В лечении опухолей такой подход особенно оправдан. Это связано с тем, что метаболизм в опухолевых клетках отличен от метаболизма в нормальных клетках. Примечательно то, что о злокачественном метаболизме известно многое, а доброкачественный продолжает развиваться. Уже сейчас определены основные метаболические пути доброкачественных и злокачественных опухолей. Самой характерной метаболической чертой в доброкачественных опухолях является усиленный синтез жирных кислот. На данный момент все больше исследователей занимаются изучением метаболизма опухолей.

Целью нашей работы являлось изучение анализа профиля экспрессии генов метаболических ферментов в клетках опухолей, ассоциированных с нейрофиброматозом I и II типов.

Материалы и методы

1. Пассирование и культивирование клеточных культур.
2. ПЦР с обратной транскрипцией.
3. Статистическая обработка полученных данных.

Результаты

В исследуемый профиль были включены гены ключевых метаболических генов, экспрессия которых предположительно повышается в опухолевых клетках. Исходя из литературных данных, была составлена панель проб к генам *CPT 1 A, CPT 2, AMPK, NDUFB1, SDHC II, UQCRB*, *COX5A, COX5A*, *FASN, ACACA-1*, *ACACA-4, ACOX-1, ACOX-2, ACOX-3, RPTOR, RICTOR, EIF4A-1, EIF4A-2, EIF4A-3, P70 (S6k)*, *4EBP1, AKT1.1*, *AKT1.2*, *PDK1 PDK2, PDK3*, *PDK4, ACADVL, ECHS 1, EHHADH, HADHB, PTEN, TSC 1, TSC 2, GSK3beta, WNT 1, WNT 2, WNT 4, WNT 5 A, NFK-PB, GAPDH.* Расчеты проводили для каждого из исследуемых генов. Используя полученные данные, выяснилось, что наибольшие различия между опухолевыми линиями и нормальными линиями характерны для следующих генов: *FASN, ACACA1, ACACA 4, ACOX 1, ACOX 2, ACOX 3, AKT 1.1, AKT 1.2.*

Также, статистически значимые различия между нормальными и опухолевыми линиями обнаружены в генах *RPTOR, RICTOR, TSC 1, TSC 2, WNT1, WNT2, WNT4, WNT5A, NFKPB.* Продукты этих генов участвуют в сигнальных путях mTOR, Wnt/b — catenin, NF-kB, что также подтверждает данные о повышенной активности этих путей в опухолевых клетках.

Следует отметить клеточную линию Hep G2 — карцинома печени, которая имеет статистически значимые различия с контролем по всем генам, за исключением *AMPK, ACACA-4, ACOX-2, eiF4A-2, p70 (S6k), PDK2, PDK1, GAPDH*. По полученным данным сделали вывод о том, что клеточная линия Hep G2 имеет наибольшие метаболические изменения среди всех исследуемых линий.

Выводы

1. Были отобраны для составления профиля гены, экспрессия которых потенциально повышена в опухолевых клетках.
2. Наибольшие различия с нормальной клеточной линией были найдены у клеточной линии Hep G2.
3. Было выявлено снижение экспрессии генов липогенных ферментов при воздействии ингибитора СЖК церуленина. При этом экспрессия всех исследуемых генов в контрольных клеточных линиях, Aco-7 и HSF, при воздействии церуленина увеличивалась. Наиболее чувствительной к ингибитору синтазы жирных кислот клеточной линией оказалась клеточная линия Hep G2. Наблюдалось снижение экспрессии всех исследуемых генов.

© А. А. Дьячкова, Д. С. Степанова, Л. А. Браун, П. А. Волковинская, Ф. В. Куликов, Э. Э. Варпетян, Н. Л. Шимановский, 2021

ИЗУЧЕНИЕ ЛОМКОСТИ ХРОМОСОМ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Д. Г. Жегло[1], В. О. Пожитнова[1], Э. П. Адильгереева[1], Е. И. Фефелова[1], А. В. Кислова[1,2], К. Д. Устинов[2], М. И. Ясиновский[2], Е. С. Воронина[1]

[1] *Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова*
[2] *Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

E-mail: anastasiiakislovav@gmail.com

Аннотация

Изучение генетической стабильности и специфики мутационного процесса в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК) актуально для применения этих клеток в регенеративной медицине, при моделировании генетических заболеваний и в фармакологических исследованиях. Геномные локусы, наиболее уязвимые к стрессу репликации, называются конститутивными ломкими сайтами (кЛС). Их выявление и картирование имеет важное значение в понимании молекулярных механизмов различных генетических патологий и онкогенеза.

Одним из ведущих факторов мутагенеза в иПСК считается стресс репликации, т. е. замедление или остановка продвижения репликационной вилки, потенциально приводящее к локально незавершенной репликации, возникновению разрывов ДНК и перестройкам. Геномные локусы, наиболее уязвимые к стрессу репликации, называются конститутивными (common) ломкими сайтами (кЛС) и могут быть выявлены как повторяющиеся хроматидные и хромосомные разрывы и пробелы на цитогенетических препаратах метафаз при культивировании в условиях стресса репликации [1, 2]. Цитогенетическое картирование кЛС в иПСК через индукцию хромосомных/хроматидных разрывов на метафазных хромосомах осложнено особенностями регуляции клеточного цикла, репарации и апоптоза в этих клетках [3]. Помимо этого, картирование кЛС в иПСК имеет важное фундаментальное значение: во многих человеческих линиях кЛС плохо картированы до сих пор, и иПСК входит в их число. Изучение и картиование кЛС важно для большего понимания молекулярных механизмов различных генетических патологий и онкогенеза [4, 5].

Целью исследования является поиск условий стресса репликации, индуцирующих хромосомные и хроматидные разрывы в метафазных хромосомах иПСК человека и цитогенетическое картирование кЛС в иПСК.

Для изучения стресса репликации в среду к клеткам добавляют мутагены, среди которых афидиколин, который препятствует репликации ДНК, ингибируя ДНК-полимеразы α, ε и δ^6, кофеин, ингибирующий ATR и ATM [7].

Согласно полученным результатам, стандартные для большинства дифференцированных клеток условия индукции кЛС (0,4 μM афидиколин) практически не вызывают хромосомные разрывы в иПСК (рис. 1).

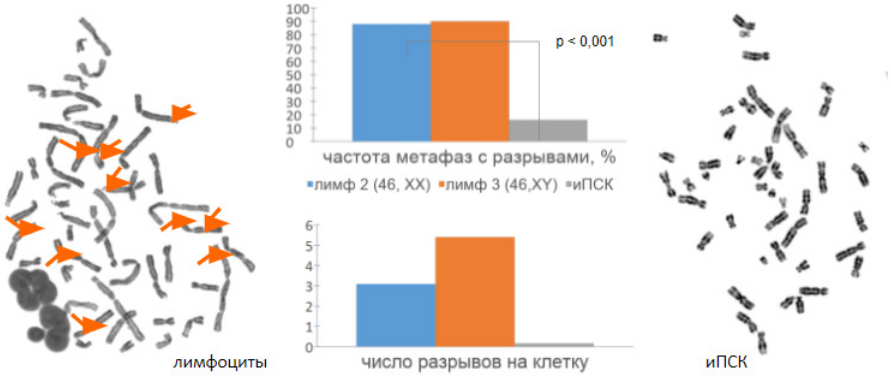


Рис. 1. Сравнение количества хромосомных разрывов в культурах лимфоцитов и иПСК при стандартных условиях индукции кЛС

Добавление к афидиколину кофеина, ингибирующего ATR и ATM, позволило индуцировать ломкость хромосом в иПСК и подобрать оптимальные условия мутагенного воздействия для дальнейшего цитогенетического картирования кЛС (рис. 2).

© Д. Г. Жегло, В. О. Пожитнова, Э. П. Адильгереева, Е. И. Фефелова, А. В. Кислова, К. Д. Устинов, М. И. Ясиновский, Е. С. Воронина, 2021

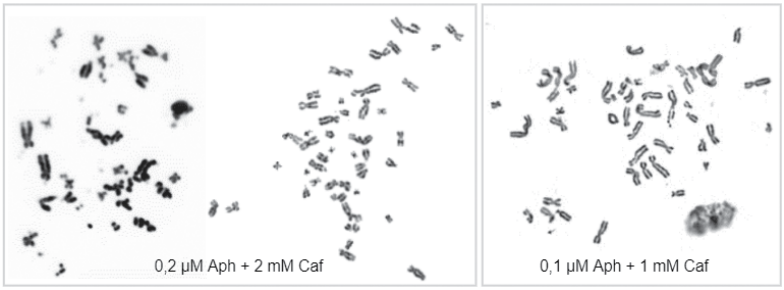


Рис. 2. Ломкость хромосом в иПСК при совместном использовании кофеина с комутагеном

В настоящее время идет работа по картированию хромосомных и хроматидных разрывов в иПСК

Литература

1. Genomic Instability in Human Pluripotent Stem Cells Arises from Replicative Stress and Chromosome Condensation Defects — ScienceDirect, accessed August 31, 2021, URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590915005019?via%3Dihub.

2. Shibo Li and Xiaohua Wu. Common Fragile Sites: Protection and Repair // Cell & Bioscience 10. 2020. Vol. 29. URL: https://doi.org/10.1186/s13578-020-00392-5.

3. Никитина Т. В., Лебедев И. Н. Регуляция стабильности кариотипа в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека // Цитология 60. 2018. No 6. URL: https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.06.01.

4. Savelyeva L., Brueckner L. M. Molecular Characterization of Common Fragile Sites as a Strategy to Discover Cancer Susceptibility Genes // Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 71. 2014. No 23. URL: https://doi.org/10.1007/s00018-014-1723-z.

5. Mocanu C., Kok-Lung Chan. Mind the Replication Gap // Royal Society Open Science 8, 2021. No 6. URL: https://doi.org/10.1098/rsos.201932.

6. Vesela E. et al. Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies // Biomolecules 7. 2017. No 1. URL: https://doi.org/10.3390/biom7010019.

7. Sabisz M., Skladanowski A. Modulation of Cellular Response to Anticancer Treatment by Caffeine: Inhibition of Cell Cycle Checkpoints, DNA Repair and More // Current Pharmaceutical Biotechnology 9. 2008. No 4. URL: https://doi.org/10.2174/138920108785161497.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ TAQ-ПОЛИМЕРАЗЫ И MMLV ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОДНОСТАДИЙНОЙ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК-СОДЕРЖАЩЕГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ (ALPHAINFLUENZAVIRUS)

К. С. Захарова[1,2], А. И. Анискина[1], Д. О. Филонов[1], А. О. Суворова[1]

[1] ООО «Люмэкс-маркетинг», Санкт-Петербург
[2] Университет ИТМО, научно-исследовательский центр биоинженерии, Санкт-Петербург

E-mail: ZakharovaKS@Lumex.ru

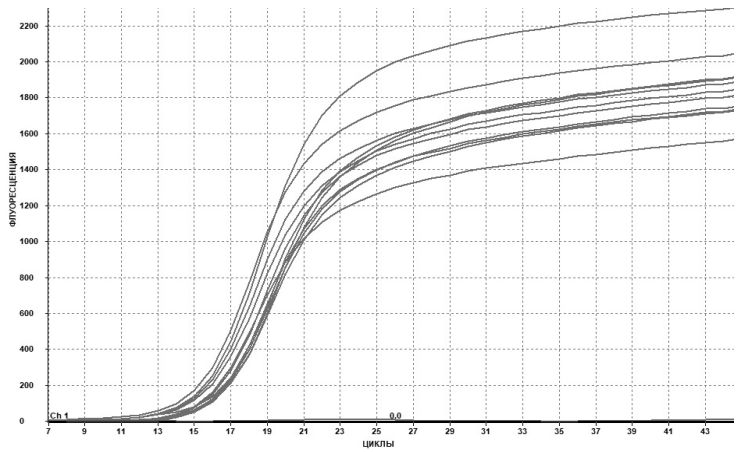
Аннотация

Предложен метод высушивания реагентов для проведения одностадийной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени на поверхности кремниевых микрочипов при помощи лиофилизации. В качестве тест-системы (ТС) использована ТС для выявления РНК-содержащего вируса Alphainfluenzavirus. На реальных пробах показана высокая эффективность предложенного метода.

Вирусы гриппа А являются высоковирулентными для отряда курообразных, вследствие чего вспышки этого заболевания заканчиваются почти 100%-й смертностью у незащищенного поголовья птиц. Микрочиповая ПЦР — один из методов, обеспечивающих быстрое выявление вируса птичьего гриппа А, позволяющий достигнуть высокой скорости нагрева и охлаждения.

Актуальной задачей экспресс-диагностики является уменьшение времени, требуемого на подготовку анализа путем иммобилизации ПЦР реактивов (праймеры и зонды, дНТФ, ферменты) в ячейках микрочипа с помощью лиофильного высушивания. Однако, существуют важные физико-химические ограничения использования данного подхода для биомолекул. Так, при удалении растворителя (воды), нарушается гидратная оболочка белка, что существенно влияет на его третичную структуру и, следовательно, на его работоспособность, что особенно заметно для термонестабильной ревертазы, необходимой для осуществления стадии обратной транскрипции.

В данной работе предложено использование стабилизирующего состава на основе трегалозы, ПВП, Tween-20. Обозначенные компоненты стабилизатора позволили сохранить пространственную конформацию белка, предположительно, по механизму частичной замены водородных связей «вода-белок» на водородные связи между белком и стабилизатором, а также образованием неспецифичных (например, Ван-дер-Ваальсовых) взаимодействий с функциональными группами белка. Показано, что лиофилизация реагентов для проведения ПЦР с добавлением стабилизаторов позволяет хранить полностью высушенные микрочипы при температуре от –20 до –23 °С, не вызывая разрушения фермента при циклах «заморозка-оттаивание». Следует отметить, что необходимым условием для сохранения лиофилизированных микрочипов в морозильной камере (т. к. это условие высокой влажности воздуха) является наличие осушителя. При попадании воды на лиофильный конгломерат



Результаты анализа на выявление РНК гриппа птиц на лиофилизированных кремниевых микрочипах. В качестве пробы использован патматериал зараженных птиц

© К. С. Захарова, А. И. Анискина, Д. О. Филонов, А. О. Суворова, 2021

происходит восстановление водородных связей между белком и водой, что при повторном замораживании и переходе воды из жидкого состояния в твердое может вызывать разрушение фермента.

В ячейках микрочипа была лиофилизирована смесь, состоящая из воды, праймеров и зондов ТС на определение возбудителя (флуоресцентный краситель FAM, производства Алкор био, Россия), дНТФ (СибЭнзим, Россия), Taq-полимеразы (СибЭнзим, Россия), MMLV обратной транскриптазы (СибЭнзим, Россия), трегалозы, ПВП, Tween-20. ПЦР-буфер не добавляли в лиофильную смесь из-за возможного высаливания и образования микрокристаллов.

Для проверки работоспособности микрочипов была взята проба РНК, выделенная из аллантоисной жидкости куриного эмбриона, искусственно зараженного вирусом птичьего гриппа.

Результаты анализа пробы на лиофилизированных микрочипах представлены на рисунке.

Показано, что лиофилизация реагентов не нарушила работоспособность фермента, как для проведения стадии ОТ, так и для проведения ПЦР.

РАЗРАБОТКА ДНК-КАССЕТЫ НА ОСНОВЕ БИНАРНОГО ДЕЗОКСИРИБОЗИМА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ФОНОВОГО СИГНАЛА ПРИ ДЕТЕКЦИИ АНАЛИТОВ

Т. П. Земерова[1], М. С. Рубель[1], Д. М. Колпащиков[1,2]

[1] *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[2] *Университет центральной Флориды, Орландо, США*

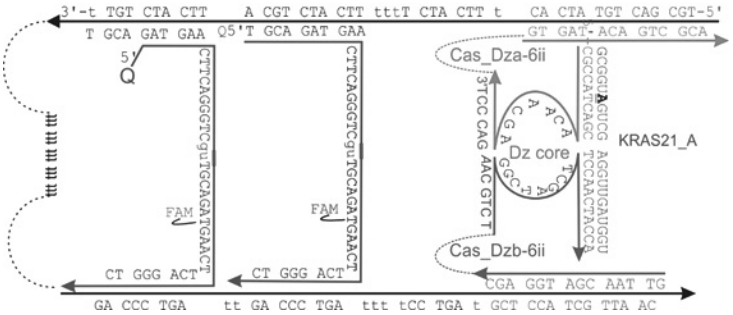
E-mail: zemerova@scamt-itmo.ru

Аннотация

Для того, чтобы повысить чувствительность диагностических систем на основе молекулярных зондов, была сформирована структура на основе бинарного дезоксирибозима — ДНК-кассета. Благодаря ее устройству ожидается значительное понижении фонового сигнала репортерных проб.

На данный момент проблема проведения достаточно чувствительной диагностики патогенных заболеваний, которая была бы одновременно быстрой, недорогой и доступной в любом месте, до сих пор остается актуальной. ПЦР в реальном времени — самый распространенный метод молекулярной диагностики, является достаточно дорогостоящим и громоздким из-за оборудования и реагентов. К одному из альтернативных методов можно отнести использование ДНК-машин на основе бинарных дезоксирибозимов — каталитически активных ДНК, которые при взаимодействии с аналитом разрушают репортерную пробу, что результируется повышением флуоресцентного сигнала [1]. Преимуществами такого метода можно назвать простоту условий реакции, малое количество реагентов, их стабильность при комнатной температуре, что позволяет использовать подобные системы для point-of-care диагностики, т. е. вне лаборатории.

В данной работе мы хотим свести к минимуму одно из основных ограничений этого метода на данных момент — высокий фоновый сигнал от репортерных проб, который значительно понижает чувствительность метода. Для этого была создана структура — ДНК-кассета, в которой несколько молекул флуоресцентного субстрата через связующий олигонуклеотид расположены в непосредственной близости друг от друга (см. рисунок). Это способствует понижению фонового сигнала за счет аккумуляции эффекта молекул-гасителей флуоресценции в составе субстрата [2]. Кроме того, за счет пространственной локализации репортерной пробы будет возможно более быстрое протекании реакции и значительное уменьшение необходимого количества флуоресцентного субстрата для чувствительной детекции.



Структура ДНК-кассеты

Литература

1. Kolpashchikov D. M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Acc Chem Res. 2019. Т. 52. No 7. С. 1949–1956.

2. Yang C. J., Lin H., Tan W. Molecular assembly of superquenchers in signaling molecular interactions // Journal of the American Chemical Society. 2005. Т. 127. No 37. С. 2772–12773.

© Т. П. Земерова, М. С. Рубель, Д. М. Колпащиков, 2021

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ HCT116 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МТТ-ТЕСТА *

А. Д. Зенина, Т. А. Григорьева

НИЛ «Молекулярная фармакология»,
Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

E-mail: asyazen@mail.ru

Аннотация

Два штамма линии аденокарциномы толстой кишки человека (HCT116), рутинно культивируемые в присутствии паклитаксела и нутлина, сохраняют резистентность к обоим соединениям после прекращения обработки препаратами.

Применение химиорезистентных клеток в качестве биологических моделей процессов, происходящих в организме человека с онкологическим заболеванием, позволяет исследовать механизмы возникающей устойчивости, определить характер клеточного ответа и провести количественную оценку необходимых параметров *in vitro*. Эти данные в дальнейшем можно использовать для разработки препаратов и схем лечения, преодолевающих резистентность клеток, тем самым повышая эффективность лечения.

В данной работе использовалась клеточная линия HCT116 (аденокарцинома толстой кишки человека). В ходе долгосрочного культивирования клеток дикого типа в среде, содержащей лекарственные препараты, было получено два резистентных штамма: к паклитакселу в концентрации 0,06мкмоль/мл и к нутлину в концентрации 30 мкмоль/мл.

Для оценки стабильности наблюдаемых клеточных эффектов и применимости полученных штаммов для исследовательских целей обработка клеток препаратами была прекращена, и далее они культивировались в обычной питательной среде. Клетки были изучены на предмет потери резистентности при помощи МТТ-теста.

Для этого клетки двух штаммов высевались в лунки 96-луночного планшета, спустя сутки вносился нутлин, либо паклитаксел в различных концентрациях. В качестве контроля использовалась питательная среда и клетки, растущие в среде без препарата. Использовали следующие концентрации препаратов: нутлин — 100, 50, 25 и 12,5 μM; паклитаксел 0,8, 0,4, 0,2 и 0,1 μM. Спустя 48 ч клетки обрабатывали раствором МТТ. Кристаллы формазана, образующиеся под действием ферментов жизнеспособных клеток за 3 ч инкубирования, растворяли в ДМСО, для спектрофотометрического анализа использовали мультимодальный ридер CLARIOstar.

Обработка данных (рис. 1, 2) показала, что клетки, ранее проявлявшие устойчивость к нутлину, сохраняют способность выживать даже при высоких концентрациях данного соединения. При обработке их паклитакселом также значительное количество популяции сохранило жизнеспособность, что свидетельствует о выраженной устойчивости к этому цитотоксическому препарату.

Клетки, культивируемые в присутствии паклитаксела, после снятия с препарата сохраняют высокий уровень устойчивости к паклитакселу, более того, его присутствие способствует росту клеток, в то же время нутлин в концентрации 50 μM подавляет 90 резистентных клеток.

Таким образом, клетки с выработанной устойчивостью к препарату не только сохраняют резистентность после удаления используемого вещества из среды, но и демонстрируют множественную резистентность к препаратам другого механизма действия.

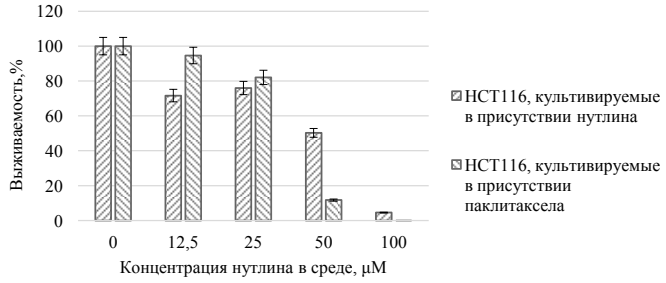


Рис. 1. Выживаемость клеток в присутствии нутлина



Рис. 2. Выживаемость клеток в присутствии паклитаксела

© А. Д. Зенина, Т. А. Григорьева, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-73-10150).

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ HEK293 ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ АНАЛОГОВ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК GAS5

Н. Д. Зинченко, Ю. И. Савиновская, М. С. Ермаков, А. А. Нуштаева, Е. В. Кулигина, Д. В. Семенов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: nikita.zinchenko.1994@mail.ru

Аннотация

Длинные некодирующие РНК (днРНК) являются регуляторами фундаментальных клеточных процессов таких, как репликация, транскрипция и трансляция.

В данной работе получены ДНК-конструкции, экспрессирующие аналоги днРНК GAS5 в клетках человека. Проведен анализ влияния эктопической экспрессии аналогов днРНК GAS5 на транскриптом фибробластов человека линии HEK293.

Длинные некодирующие РНК являются pol 2-транскриптами длиной более 200 нуклеотидов, не кодирующими белки. ДнРНК являются регуляторами множества молекулярно-биологических процессов, в том числе пролиферации, метастазирования и гибели раковых клеток. Поэтому изучение функций днРНК является перспективным направлением биомедицинских исследований.

Ген *GAS5* (*growth arrest specific 5*) человека кодирует 10 C/D-бокс малых ядрышковых РНК и днРНК GAS5. ДнРНК GAS5 является представителем класса нкРНК, для которой установлены онкосупрессивная и проапоптотическая функции. Известно, что уровень днРНК GAS5 снижен в клетках злокачественных новообразований человека. Повышение уровня днРНК GAS5 в раковых клетках ведет к снижению их пролиферативной активности и жизнеспособности, а также к активации проапоптотических процессов. Поэтому днРНК GAS5 служит перспективным объектом для создания новых стратегий диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Целью данной работы является анализ функций днРНК GAS5 в клетках человека в условиях эктопической экспрессии данной днРНК. Для этого нами были получены ДНК-конструкции, экспрессирующие аналоги днРНК GAS5 человека.

Фибробласты почек эмбриона человека HEK293 трансфицировали полученными векторами и проводили анализ влияния эктопической экспрессии днРНК GAS5 на транскриптом этих клеток. Установлено, что эктопическая экспрессия днРНК GAS5 в клетках сопровождается повышением уровня 165 и понижением уровня 84 РНК. Установлено также, что аналоги днРНК GAS5 модулируют активность факторов транскрипции SUZ12 и EZH2, образующих поликомб-комплекс PRC2. Таким образом, механизм проапоптотического действия днРНК GAS5 в клетках человека включает в себя регуляцию процессов компактизации/декомпактизации хроматина с участием PRC2.

© Н. Д. Зинченко, Ю. И. Савиновская, М. С. Ермаков, А. А. Нуштаева, Е. В. Кулигина, Д. В. Семенов, 2021

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С АМПЛИФИКАЦИЕЙ ДЛИННОГО ПЛЕЧА 8 ХРОМОСОМЫ*

М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, М. М. Цыганов, Н. В. Литвяков

Научно-исследовательский институт онкологии
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

E-mail: imk1805@yandex.ru

Аннотация

Известно, что гиперэкспрессия онкогенов в опухолевых клетках, которые необходимы для их роста и развития, часто достигается за счет амплификации. Амплификация различных онкогенов в опухолевых клетках является важным прогностическим фактором развития рака, а также может изменить подход к лекарственной терапии (химио-, гормоно-, таргетной терапии) опухолей различных локализаций, в том числе и рака молочной железы (РМЖ). В настоящее время известно, что по частоте встречаемости при опухолях всех локализаций (177 типов опухолей) амплификация длинного плеча 8 хромосомы (8q), в частности 8q24, является наиболее распространенной аберрацией числа копий (CNA) и встречается более чем в 30 % всех образцов. В этой связи актуальным представляется проведение полнотранскриптомного анализа экспрессии генов в опухоли молочной железы с амплификацией длинного плеча 8 хромосомы в процессе предоперационной химиотерапии.

Материал и методы

В исследование включены 60 больных РМЖ T1-4N0-2M0 (IIA–IIIB стадии) люминального B подтипа, в возрасте 22–68 лет (средний возраст 46,2 ± 0,4 лет). Для исследования использовали парные образцы биопсийного и операционного материала для каждого из пациентов. Выделение ДНК и РНК осуществлялось при помощи наборов QIAamp DNA mini Kit и RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Наличие амплификаций до лечения и после неоадъювантной химиотерапии (НХТ) определялось с использованием микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Экспрессию генов оценивали при помощи микроматрицы Clariom S Assay Human (Affymetrix, USA). Для биоинформатического анализа использовались базы данных Reacthome и dbEMT.

Результаты

Частота амплификации 8q в опухоли больных до лечения составила 62 % (37/60). Из 37 больных амплификация 8q в опухоли после проведения НХТ сохранилась у 24 (65 %), кроме этого еще у 3-х пациентов амплификации 8q в опухоли возникли de novo. Количество ДЭГ в опухоли до лечения у больных с наличием или отсутствием амплификации 8q составило 105 генов (41 up-regulated, 64 down-regulated) (здесь и далее p-value < 0,05). После проведения НХТ количество ДЭГ в опухоли больных составило 2137 генов (1394 up-regulated, 780 down-regulated) (рис. 1, А, Б). Показано, что ДЭГ у пациентов с наличием или отсутствием амплификации 8q до и после НХТ пересекаются

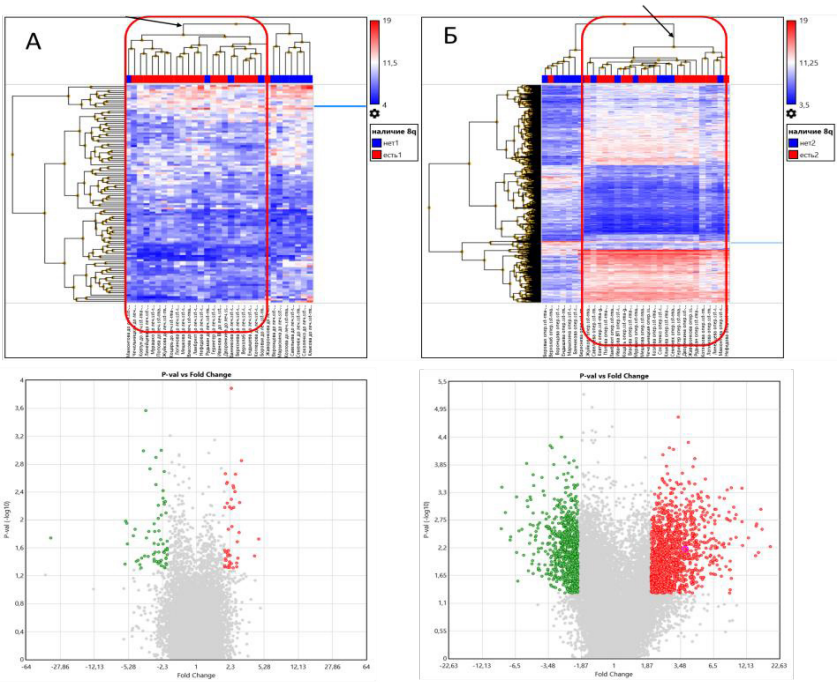


Рис. 1. Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: А — до лечения с наличием (есть 1) и без амплификации 8q (нет 1); Б — после НХТ с наличием (есть 2) и без амплификации 8q (нет 2)

© М. К. Ибрагимова, Д. С. Долгашева, М. М. Цыганов, Н. В. Литвяков, 2021

* Работа выполнена в рамках конкурса 2021–2023 гг. на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

по 8 генам: *chr1–NBPF4*, *PI4KB*; *chr4–UGT2B11 UDP*, *UGT2B28 UDP*; *chr8–PLAT*; *CHR12–MYBPC1*; *chr18–SETBP1*; *chr19–ZNF223*.

В топ-10 сигнальных путей попали MAPK Signaling Pathway и Circadian rhythm related genes для опухолей до лечения и после НХТ, различающихся по наличию в опухоли амплификации 8q.

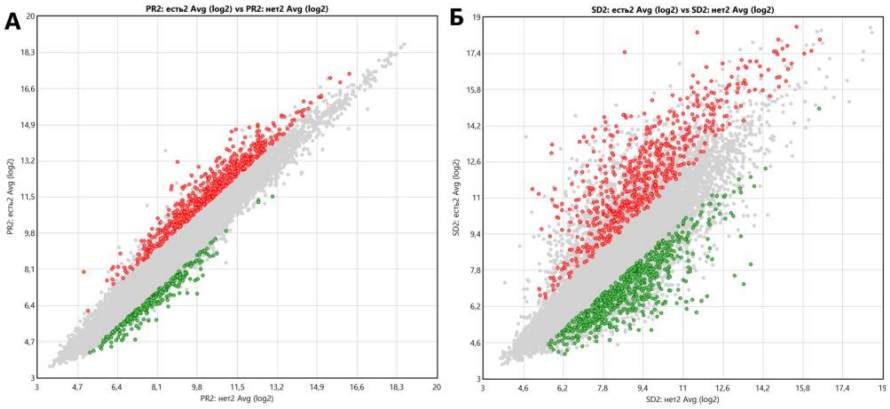


Рис. 2. Количество ДЭГ в опухоли после НХТ с наличием или отсутствием амплификации 8q: *А* — на фоне ЧР; *Б* — на фоне СТ

При частичной регрессии (ЧР) количество ДЭГ в опухоли после НХТ с различным статусом амплификации 8q составило 879 (601 up-regulated, 278 down-regulated). На фоне стабилизации (СТ) количество ДЭГ составило 1321 (652 up-regulated, 669 down-regulated) (рис. 2, А, Б).

Установлено, что ДЭГ у пациентов с наличием или отсутствием амплификации 8q после НХТ на фоне ЧР и СТ пересекаются по 145 генам.

Заключение

Изучен спектр ДЭГ и сигнальных путей, активированных / инактивированных в опухолях молочной железы до лечения / после НХТ, в зависимости от наличия амплификации 8q и ответа на НХТ.

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ*

М. К. Ибрагимова[1,2], И. А. Цыденова[1,2], М. М. Цыганов[1], Н. В. Литвяков[1]

[1] *Научно-исследовательский институт онкологии Томского НИМЦ*
[2] *Томский государственный университет*

E-mail: tsydenova422@gmail.com

Аннотация

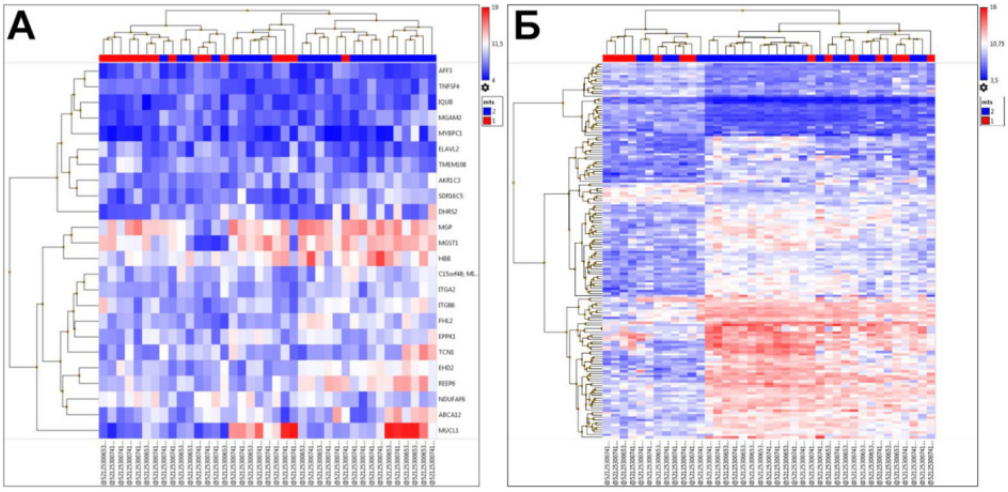
Важнейшим аспектом в современном подходе к лечению рака молочной железы (РМЖ) является мировой тренд в направлении прецизионной медицины, в том числе и в отношении неоадъювантной (предоперационной) химиотерапии (НХТ). Для применяемой системной химиотерапии не существует общепринятых маркеров для персонализированного назначения химиопрепаратов. При этом, на сегодняшний день крайне малочисленны данные по сравнению экспрессионного профиля пациенток с диагнозом РМЖ в процессе проведения НХТ. Как правило, исследования в данном направлении затрагивают именно молекулярное профилирование опухоли в процессе лечения. Целью представленного исследования явилось проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в процессе НХТ в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

Материалы и методы

В исследование включены 60 больных РМЖ T1-4N0-2M0 (IIA–IIIB стадии) люминального B подтипа, в возрасте 22–68 лет (46,2 ± 0,4). Пациенты получали 4–8 курсов системной НХТ по схемам FAC, AC, CAX, CP, ACT и AT. Материалом служили парные образцы биопсийного (до лечения) и операционного материала (после НХТ) для каждого из пациентов. РНК из исследуемого материала выделялась набором RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Анализ данных осуществлялся при помощи программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты

При проведении сравнения экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия / отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ было показано, что количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated) (см. рисунок а, б).



Тепловая карта ДЭГ в опухоли больных РМЖ: А — до лечения с наличием (красный) и отсутствием (синий) гематогенного метастазирования; Б — после НХТ с наличием (красный) и отсутствием (синий) гематогенного метастазирования

© М. К. Ибрагимова, И. А. Цыденова, М. М. Цыганов, Н. В. Литвяков, 2021

* Исследования выполнены в рамках конкурса 2021–2023 г. на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием / отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются по 1 гену — EHD2 (19q13.33). EHD2 признан прогностическим параметром для плоскоклеточного рака пищевода — экспрессия данного гена вовлечена в его патогенез и может рассматриваться в качестве фактора прогрессирования для пациентов с РМЖ — он является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках РМЖ.

Вывод

Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия / отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ. Полученные результаты могут являться платформой для персонализированного подхода в диагностике и лечении отдаленного метастазирования при РМЖ.

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ДЛЯ ПОИСКА ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ *

А. Д. Казакова [1], П. С. Ямщиков [1], М. Р. Патышева [1,2], Е. О. Казакова [1], М. А. Ракина [1], С. Г. Афанасьев [2], А. С. Тарасова [2], И. В. Ларионова [1,2], Ю. Г. Кжышковска [1]

[1] Томский государственный университет
[2] Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

E-mail: a.kazakova99@mail.ru

Аннотация

В ходе полнотранскриптомного секвенирования моноцитов периферической крови больных колоректальным раком (КРР) и здоровых доноров выявлены различия в транскриптоме моноцитов групп сравнения. На основании полученных данных отобраны гены, с выраженно повышенной транскрипцией, для которых провели валидацию на независимой выборке пациентов с КРР и здоровых доноров методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Введение

Исследования на животных моделях и пациентах с КРР продемонстрировали, что опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) подавляют рост первичной опухоли и метастазы. Циркулирующие моноциты рекрутируются в опухоль и составляют основной пластический ресурс ОАМ. Однако роль программирования циркулирующих моноцитов в функциональной поляризации и активации про- и противоопухолевых функций ОАМ изучена недостаточно.

Методы

Моноциты периферической крови пациентов с КРР и здоровых доноров были выделены с помощью FACS. Была выделена РНК и подготовлены библиотеки кДНК. Полнотранскриптомный профиль моноцитов определяли с помощью NGS. Биоинформатический анализ включал контроль качества прочтений, картирование полученных прочтений (программа STAR 2.5), подсчет полученных прочтений (программа QoRTs), далее, при помощи программного пакета DESeq2 в среде R, получали данные о дифференциальной экспрессии генов между двумя исследуемыми группами, для представления результатов NGS мы использовали Hallmark, Reactome, KEGG и GO. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местным комитетом по медицинской этике на базе НИИ Томского национального исследовательского медицинского центра.

Результаты

С помощью биоинформатической обработки данных был проведен сравнительный анализ транскриптома моноцитов больных КРР и моноцитов здоровых доноров. Были выявлены дифференциально-экспрессирующиеся гены и транскрипционные сигнатуры, ассоциированные с КРР. Функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов было проведено с целью идентификации сигнальных путей, характерных для моноцитов больных КРР и здоровых доноров. Используя параметр NES > 1,5, мы обнаружили, что в моноцитах пациентов активируются следующие программы транскрипции: LPS-опосредованный ответ, дифференцировка клеток, регуляция циклин-зависимых киназ, транспорт железа, IL-4-зависимый ответ, INF-гамма-зависимый ответ, ангиогенез, клеточная адгезия, миграция лейкоцитов, хемотаксис, образование коллагена. Программы транскрипции, отвечающие за ацетилирование и метилирование гистонов, перестройку хроматина и модификацию белков, подавлялись в моноцитах пациентов с КРР. По результатам биоинформатического анализа были выбраны следующие гены интереса, для которых провели валидацию на независимой выборке пациентов с КРР и здоровых доноров методом ПЦР-РВ: PFKFB3, DNAJB1, TNFAIP3. Эти гены относятся к семействам ферментов, белков теплового шока и регуляторам сигнальных путей, соответственно.

Выводы

Мы выявили новые дифференциальные паттерны программирования моноцитов у пациентов с КРР по сравнению со здоровыми донорами. На выбранных генах мы подтвердили результаты РНК секвенирования для независимой выборки. Наши данные позволят нам прояснить транскрипционные и эпигенетические механизмы программирования ОАМ при КРР.

© А. Д. Казакова, П. С. Ямщиков, М. Р. Патышева, Е. О. Казакова, М. А. Ракина, С. Г. Афанасьев, А. С. Тарасова, И. В. Ларионова, Ю. Г. Кжышковска, 2021

* Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-15-00151.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ НАСЕКОМЫХ СЕМЕЙСТВА SIMULIIDAE И CERATOPOGOIDAE*

Е. П. Каманова, М. Е. Старчевская, Т. С. Непомнящих, Д. В. Антонец

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

E-mail: kamanovae@gmail.com

Аннотация

Из базы данных NCBI SRA были взяты 8 геномных образцов семейства *Simuliidae* и 23 геномных образца семейства *Ceratopogonidae*. Для прочтений, полученных при секвенировании образцов, принадлежащих к семейству *Simuliidae, в результате сборки* были обнаружены континги, ассоциированные с вирусами растений (*Phycodnaviridae, Potyviridae*) и бактерий (*Ackermannviridae, Herelleviridae, Myoviridae, Podoviridae, Rountreeviridae, Siphoviridae*). Для образцов семейства *Ceratopogonidae* были обнаружены континги, относящиеся к вирусам растений (*Chlorovirus, Potyviridae*) и бактерий (*Autographiviridae, Podoviridae, Ackermannviridae*). Для обоих групп анализируемых образцов были выявлены вирусы насекомых семейств *Baculoviridae* и *Flaviviridae*, а также бактериофагов *Myoviridae.*

Насекомые часто выступают переносчиками многочисленных инфекционных заболеваний растений, животных и человека. Особого внимания заслуживают кровососущие насекомые из подотряда *Nematocera*, поскольку они могут передавать опасные вирусные инфекции человека, такие как лихорадка Зика и денге, желтая лихорадка и многие др. Вирусные инфекции сельскохозяйственных животных, передаваемые кровососущими насекомыми, могут привести к серьезным экономическим потерям. До сих пор такие важные группы *Nematocera*, как семейства *Simuliidae* и *Ceratopogonidae,* а также вирусы, связанные с ними, остаются в значительной степени неизвестными. Тем не менее было показано, что представители семейства *Simuliidae* могут передавать вирус везикулярного стоматита домашним свиньям. Было также обнаружено, что они играют роль в передаче вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей и вируса миксоматоза. Метагеномные исследования очень важны, поскольку они могут дать лучшее понимание разнообразия, экологии и эволюции микроорганизмов, а также помочь идентифицировать новые патогены и пути их передачи.

С целью определения генетических последовательностей вирусов, был проведен метагеномный анализ общедоступных геномных данных. Из базы данных NCBI SRA были отобраны 8 геномных образцов семейства *Simuliidae* и 23 геномных образца семейства *Ceratopogonidae.* Секвенированные прочтения были классифицированы на основе нуклеотидной базы данных NCBI nt с помощью программного обеспечения Kraken2. Более 20 % прочтений остались неклассифицированными. Неклассифицированные прочтения и прочтения, ассоциированные с вирусами, были отобраны и собраны с помощью программы metaSPAdes. Полученные контиги с покрытием не менее 20 и длиной 500 п.н. и более, подвергали функциональной аннотации. Открытые рамки считывания были предсказаны с помощью Prodigal. Как для семейства *Simuliidae,* так и для *Ceratopogonidae* были получены аминокислотные последовательности и проанализированы на наличие консервативных доменов. Было предложено несколько белок-кодирующих генов, специфичных для нуклеополиэдровирусов (*Nucleopolyhedroviruses*), принадлежащих к семейству *Baculoviridae* и *Flaviviridae*, которые, как известно, инфицируют различные группы насекомых. Обнаружены континги, принадлежащие вирусам растений (семейство вирусов *Phycodnaviridae*, *Potyviridae*, род *Chlorovirus*). Многие последовательности были отнесены к бактериофагам семейства *Myoviridae* и вирусам бактерий семейства *Autographiviridae, Podoviridae, Ackermannviridae, Herelleviridae, Myoviridae, Rountreeviridae, Siphoviridae*, а также к неклассифицированным вирусам дцДНК. Большое количество контигов все еще остается не классифицированным.

© Е. П. Каманова, М. Е. Старчевская, Т. С. Непомнящих, Д. В. Антонец, 2021

* Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2019-1665).

ГЕПАТОБИЛИАРНАЯ ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗЫВАЕМАЯ ПАРАЗИТИРОВАНИЕМ OPISTHORHIS FELINEUS, ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ ПОЧЕЧНОЙ ПАТОЛОГИИ, УСИЛИВАЮЩЕЙСЯ В ДИНАМИКЕ ИНФЕКЦИИ *

Я. К. Капущак, О. Г. Запарина, М. Ю. Пахарукова, В. А. Мордвинов

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: YarikKaps@yandex.ru

Аннотация

Описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felineus* — распространенное паразитарное заболевание, характеризуется постепенным развитием заболеваний печени. Работа посвящена структурно-функциональному исследованию развития патологии почек на общепринятой модели описторхоза *Mesocricetus auratus*, и изучение этого процесса в динамике 1–18 месяцев.

Описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felineus* — распространенное паразитарное заболевание, характеризуется постепенным развитием заболеваний печени. *Opisthorchis felineus* широко распространен на территории России, в эндемичных регионах, особенно в Западной Сибири, уровень заражения варьирует от 10 до 50 %. Сведения о возможном развитии патологии почек при описторхозе были получены в рамках клинических наблюдений, однако экспериментальной работы в этом направлении ранее не проводили.

Цель данного исследования заключалась в оценке вероятности развития патологии почек на общепринятой модели описторхоза *Mesocricetus auratus*, и изучение этого процесса в динамике 1–18 месяцев.

В рамках исследования мы провели морфометрическую оценку гистологических изменений в тканях почки. Также мы провели измерение биохимических маркеров, указывающих на почечную патологию (белок в моче, креатинин и содержание маркера повреждения проксимального канальца белка (Kidney Injury Molecule — 1, KIM-1).

Мы обнаружили значительное повышение уровня белка в моче и креатинина в сыворотке крови к 18-му месяцу (более чем в 20 раз, $P < 0,05$ и в 4 раза, $P < 0,05$, соответственно). Оба параметра напрямую зависели от срока инфицирования ($P < 0,001$ и $P < 0,001$, соответственно). Уровень изменения KIM-1 был достоверно повышен в моче с 6-го по 18-ый месяц в 3–5 раз ($P = 0,05$).

В почках были выявлены выраженные структурные изменения — цилиндры, плотные белок-положительные структуры, которые приводили к механическому повреждению окружающего эпителия. Количество цилиндров было значительно повышено, как в мозговом (до 29 раз, $P < 0,05$) так и в корковом слое (до 5,6 раз, $P < 0,5$). Согласно данным линейного регрессионного анализа, количество цилиндров увеличивалось от срока инфекции ($P = 0,004$ и $P = 0,07$, соответственно). «Пространство Боумена», которое представляет начало мочевого пространства и прилегает к проксимальному извитому канальцу нефрона, было достоверно расширено на всех сроках инфекции в 3,2–5,2 раза ($P < 0,05$).

Были обнаружены также признаки интерстициального фиброза. Так, расширение мезангиальной зоны гломерулы (1,7–3,2 раза, $P < 0,01$), в основном представленное межклеточным компонентом, зависело от продолжительности инфекции ($T = 4,58$, $P < 0,001$) и на 18-м месяце мезангиальная зона составляла 35 % площади гломерулы против 10 % у контрольной группы.

Наиболее важным результатом работы была найденная положительная взаимосвязь между выраженностью поражений печени при описторхозе (перидуктальный фиброз) и тяжестью повреждений почек (увеличение мезангиального матрикса), согласно проведенному анализу на ковариацию ($cov = 46,8$).

Таким образом, динамика структурных изменений и показателей функциональной недостаточности почек хомячков, инфицированных *O. felineus,* зависит от продолжительности инфекции и коррелирует с динамикой патологического процесса в тканях печени.

© Я. К. Капущак, О. Г. Запарина, М. Ю. Пахарукова, В. А. Мордвинов, 2021

* Работа поддержана грантом РФФИ № 20-415-543016_р_мол_а_Новосибирск.

ИНДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HAP1 *

Г. С. Кокшарова

Новосибирский государственный университет
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: g.koksharova@g.nsu.ru

Аннотация

Хромосомные перестройки могут иметь различные фенотипические проявления: они ассоциированы с широким спектром наследственных патологий, но в то же время встречаются и у людей с нормальным фенотипом. Молекулярные механизмы проявления структурных аномалий хромосом известны не полностью. Мы создали модельную клеточную линию, позволяющую индуцировать большое разнообразие комбинаторных перестроек между определенными случайно выбранными участками генома. Данная линия будет использована для изучения взаимосвязи между хромосомными перестройками и нарушением эпигенетической регуляции генома.

Фенотипическое проявление хромосомных перестроек обусловлено различными молекулярными механизмами, в том числе нарушением кодирующей последовательности генов или изменением количества их копий. Однако многие проявления имеют более сложные механизмы, связанные с нарушением эпигенетической регуляции генетической информации. Ранее было показано, что как минимум 7 % наследственных транслокаций у человека связаны с изменением трехмерной организации генома [1]. Кроме того, интересными для нас являются перестройки, связанные с эффектом положения и нарушением взаимодействий регуляторных цис-элементов.

Для изучения влияния перестроек на функционирование генома мы создали модельную клеточную линию, позволяющую получать комбинаторные хромосомные перестройки. Ее особенностью является то, что она создана на основе линии клеток человека HAP1, имеющих гаплоидный кариотип (за исключениям участка хромосомы 15). Таким образом, почти все внесенные перестройки находятся в гемизиготном состоянии. Перестройки происходят между заранее известными сайтами, интегрированными в геном случайным образом. Выравненность генетического фона при анализе обеспечивается использованием субклонов полученной линии с разными вариантами перестроек. Все это позволяет проводить анализ эпигенетических изменений, вызванных перестройками хромосомного материала.

Индукция хромосомных перестроек в нашей модели обеспечивается использованием системы Cre/LoxP. Мы разработали стратегию интеграции последовательностей LoxP-сайтов в случайные места генома с помощью мобильных элементов системы Sleeping Beauty, а также стратегию локализации интеграций на основе inverse-PCR. Длительная экспрессия Cre-рекомбиназы в нашей модели обеспечивается интеграцией в локус AAVS1 гена Cre под регуляцией доксициклин-индуцибельного промотора.

На данный момент мы получили линии с примерно 20 LoxP-сайтами на геном, в которых индуцировали перестройки на протяжении одного месяца. В результате различные внутрихромосомные перестройки произошли не менее чем в 10 % клеток, а транслокации — около 1 % клеток.

Литература

1. Redin C., Brand H., Collins R. L. et al. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies // Nature Genetics. 2017. Vol. 49. P. 36–45. https://doi.org/10.1038/ng.3720.

© Г. С. Кокшарова, 2021

* Данная работа выполнена при поддержке гранта № 2019-0546 (FSUS-2020-0040) Министерства науки и высшего образования РФ.

DEVELOPMENT OF «AND-GATE» LOGIC ELEMENT BASED ON BINARY DEOXYRIBOZYME

O. S. Kolosova[1,2], V. S. Drozd[2], V. V. Smirnov[2], A. I. Kalnin[2], D. M. Kolpashchikov[2,3]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *ITMO University, Laboratory of Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies, St. Petersburg*
[3] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: kolosova.olga.msu@gmail.com

Abstract

In this study the DNA-nanomachine (DNM) based on binary deoxyribozyme (DNAzyme) was developed that can successfully operate as a logic element «AND-gate» and carry out input-dependent cleavage of targeted RNA. The cleavage efficiency of the DNM reaches 59 % related to original DNAzyme 10–23.

Generally, logic gates are systems that recognize one or more input signals, process them according to predetermined principles, and produce output signals: 1 or 0. The convenience of using DNMs as logic gates is that it is possible to program and predict the behavior of such structures due to the principle of complementarity. Thus, the application of DNMs as logic elements is a step towards creating a «molecular computer» capable of a comprehensive analysis of inputs: DNA or RNA strands [1].

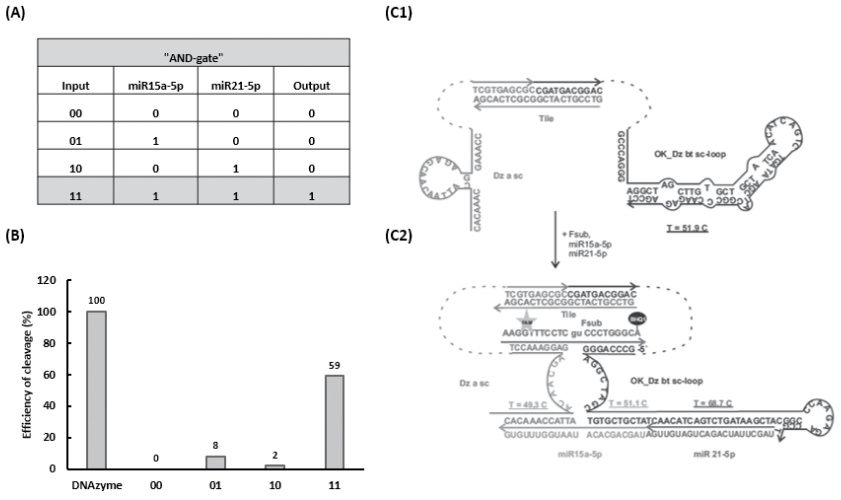
The microRNAs miR15a-5p, miR21-5p (are considered as cancer markers of neuroblastoma) are served as inputs.

The rule for the «AND-gate» DNM is «substrate cleavage (output = 1) can only occur in the presence of miR 15a-5p and miR 21-5p in solution (input = 11). Otherwise, the substrate remains intact (output = 0)» (fig. A).

Binary DNAzyme was created based on DNAzyme 10–23 by splitting the catalytic core sequence between two separate oligonucleotides [2]. Then, a logic gate was developed based on binary DNAzyme. In the creation of the DNM, the arms Dz_a_sc and Dz_b_sc were designed with complementary attachment to a common DNA scaffold (Tile), which was aimed to keep arms together and thus increase the performance rate of formed complexes. The Dz_a_sc and Dz_b_sc hybridization with the inputs miR 15a-5p and miR 21-5p forms the catalytic core, which cleaves the target substrate (Fsub) (fig. C).

The DNM was assembled using annealing. Then, a cleavage reaction was carried out in a reaction buffer with the sequential addition of DNM, microRNAs, and substrate. The DNAzyme 10–23 was used as a positive control. The Fsub molecule containing a fluorophore and a quencher at diverse ends was used as a synthetic model of a substrate to detect fluorescence after cleavage. The fluorescence was estimated after 3-hour incubation (T = 37 °C) using a fluorometer. The fluorescence intensity for different input combinations was calculated using the normalization method (linear normalization) in comparison to the positive control.

The results of this study demonstrate that «AND-gate» was assembled and successfully produced output signals in full compliance with its truth table. The value 59 % of substrate cleavage was achieved for output=1, and 2–8 % for output=0 in comparison to the positive control (fig. B). Besides the «AND-gate» there were developed «YES-gate» (which can be ac-



A — «AND-gate» truth table; B — the efficiency of Fsub cleavage by «AND-gate»; C1 — inactivated «AND-gate» (output = 0); C2 — activated «AND-gate» (output = 1)

© O. S. Kolosova, V. S. Drozd, V. V. Smirnov, A. I. Kalnin, D. M. Kolpashchikov, 2021

tivated by one microRNA) and «3i AND-gate» (which can be activated by three microRNAs) DNMs that also operated according to predesign logic.

Prospects for the use of such systems are broad in both diagnostics and therapy. For example, the specific RNA or DNA presence may be detected with fluorescence estimation. Moreover, the placing of DNMs in tumor cells allows selective cleavage of mRNA only in the presence of oncomarkers.

References

1. Macdonald J., Stefanovic D., Stojanovic M. N. // Scientific American. 2008. DOI: 10.1038/scientificamerican1108-84.

2. Gomes A. G. de Oliveira, Dubovichenko M., Eldeeb A. A. et al. // ChemBioChem. 2021. DOI 10.1002/cbic.202000769.

ПОСТРОЕНИЕ СЕТЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ГЕНОМНОЙ ИНФОРМАЦИИ*

Т. Н. Лахова[1], Д. Ю. Ощепков[1], А. М. Мухин[1], С. А. Лашин[1,2]

[1] *Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: tlakhova@bionet.nsc.ru

Аннотация

В работе представлен алгоритм построения регуляторных сетей бактерий на основе геномной информации. Элементами сети являются транскрипционные факторы, гены-мишени, на которые направлена регуляция (опционально — опероны). Данные об элементах и их связях получаются с помощью алгоритма по поиску ТФ, конвейера по предсказанию ССТФ и по первичной аннотации бактериальных геномов.

С каждым годом объем секвенированных геномных данных неуклонно растет. Однако анализ этих данных отстает от темпов их накопления, в частности в контексте регуляции транскрипции. Немаловажным является тот факт, что с помощью различных экспериментальных методик появляются новые знания о регуляторных взаимодействиях, но все же остается малоизученным вопрос о регуляторных сетях в бактериях. Например, для модельного организма *Escherichia coli* до сих пор не полностью решена задача о полном описании генетической регуляции [1]. В то же время, для других модельных организмов, например, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* или *Corynebacterium glutamicum* известно еще меньше информации [2, 3].

Регуляция транскрипции у бактерий совершается при помощи ряда механизмов, одним из которых является регуляция транскрипционными факторами (ТФ) — регуляторными белками, которые связываются специфичным образом с короткими нуклеотидными последовательностями в структуре промотора ДНК, т. е. сайтами связывания транскрипционных факторов (ССТФ).

В рамках работы анализировались аннотированные геномы бактерий из базы данных Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН. Анализируемые геномы дополнительно размечались ТФ и ССТФ, поскольку первичная автоматическая аннотация не представляет такой информации. Для этой цели были реализованы алгоритм и программный конвейер, чтобы предсказать ТФ и их сайты связывания. Основной язык разработки — Python. Использовались сторонние программные пакеты: Blast+ (выравнивание на аннотированные геномы бактерий), Operon-mapper (предсказание оперонной структуры в геномах бактерий), BoBro2.0 (предсказание мотивов), программа Tomtom из пакета MEME Suite (сравнение предсказанных мотивов с ССТФ известных ТФ), а также собственная программа для генерации промоторных областей предсказанных оперонов, реализованная на языке Python с помощью библиотек pandas, re и Biopython.

На основе полученных результатов поиска ТФ и ССТФ строятся регуляторные графы. Алгоритм построения сетей также реализован на языке Python с использованием библиотеки pandas. Программа позволяет генерировать сеть как с оперонной структурой, так и без нее. В последнем случае указывается непосредственное регулирование генов ТФ. Это может быть удобным для дальнейшего полуавтоматического или автоматического анализа сетей. Визуализация сетей осуществляется с помощью Cytoscape. В дальнейшем на основе сетей регуляции транскрипции планируется создавать математические модели.

Литература

1. Santos-Zavaleta A. et al. RegulonDB v 10.5: tackling challenges to unify classic and high throughput knowledge of gene regulation in E. coli K-12 // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47. No D1. P. D212–D220.

2. Kiliç S. et al. CollecTF: A database of experimentally validated transcription factor-binding sites in Bacteria // Nucleic Acids Res. 2014. Vol. 42. No D1. P. 156–160.

3. Parise M. T. D. et al. CoryneRegNet 7, the reference database and analysis platform for corynebacterial gene regulatory networks // Sci. Data. Springer US. 2020. Vol. 7. No 1. P. 1–9.

© Т. Н. Лахова, Д. Ю. Ощепков, А. М. Мухин, С. А. Лашин, 2021

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

MICROTUBULE BENCH AS A PLATFORM TO PROBE INTERACTIONS BETWEEN DNA REPAIR FACTORS AND FUS IN CELLS*

E. M. Mamontova[1–3], M. V. Sukhanova[1], V. Joshi[2], O. I. Lavrik[1,3], D. Pastré[2]

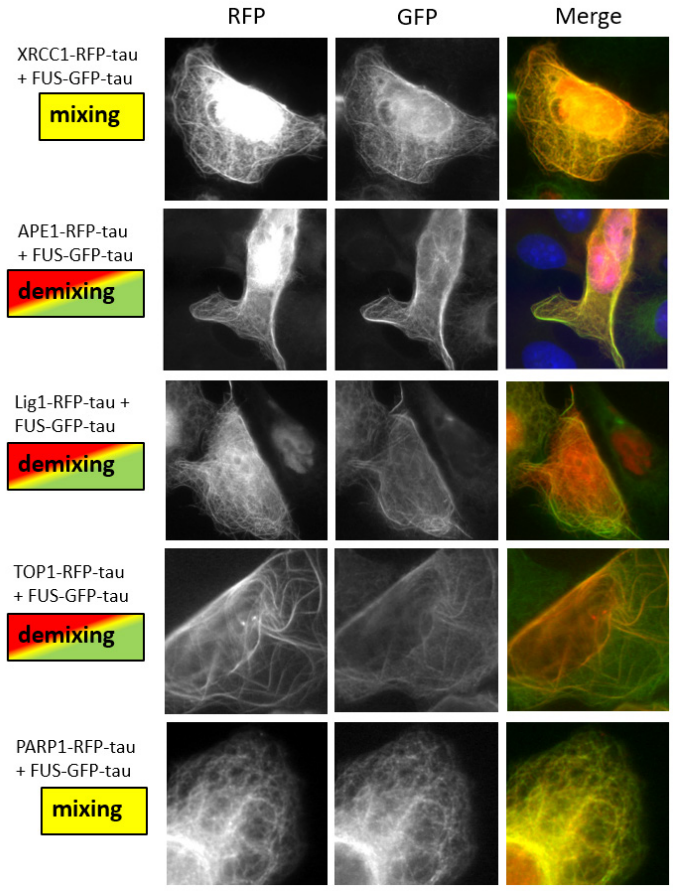
[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *SABNP, University of Evry, INSERM U1204, University Paris-Saclay, Evry, France*
[3] *Novosibirsk State University*

E-mail: evgeniya.mamontova@univ-evry.fr

Abstract

In the present study we tested the interactions between DNA repair factors and RNA-binding protein FUS (FUS/TLS, Fused in Sarcoma) in cell by using new «microtubule bench» method. It has been found that two DNA repair proteins, namely poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) and X-Ray Repair Cross Complementing 1 (XRCC1), can form compartment with FUS on microtubules indicating their ability to interacts with FUS directly or through their binding to PARP1-bound poly (ADP-ribose) (PAR).

Mammalian cells are constantly exposed to genotoxic stress and, therefore, have developed mechanisms for detection, signalling and repair of damaged DNA. One of the earliest cellular responses to genotoxic stress is the recognition of DNA damage sites by the members of the (ADP-ribosyl) transferase family such as PARP1, and the synthesis of long and branched poly (ADP-ribose) chains (PAR) covalently attached to themselves or to acceptor proteins. Currently, dozens of proteins PARylated or specifically interacting with PAR have been identified *in vivo*, some of these proteins are RNA-binding. Both the elevated occurrence of PARylation among RNA-binding proteins and their accumulation at the sites of laser-induced DNA damages raise issues about the putative role of RNA-binding proteins in DNA repair.



Images of HeLa cells co-expressing FUS-GFP-Tau and DRP-RFP-Tau (DRP — DNA repair protein). We observe the spatial segregation on microtubule in case of APE1, Lig1 and TOP1

We focused our attention on FUS, the member of FET protein family (together with EWSR1 and TAF15). It is one of the most enriched protein factors recruited in DNA damage regions and one of the most highly PARylated nuclear RNA-binding proteins after oxidative stress [1]. Moreover, FUS is known to form membraneless compartments through interactions occurring between its low complexity domains. It was previously demonstrated that FUS in the presence of PAR generates dynamic compartments in which damaged DNA is accumulated [2]. We suppose that the formation of such compartments at DNA damage sites may also help to concentrate DNA repair factors where they are needed the most. However, which DNA repair factors can be recruited to FUS-rich membraneless compartments is yet to be determined.

To investigate DNA repair factors recruited to FUS-rich compartments we used a new «microtubule bench» method which allows to analyse the mixing/demixing of two different phases in a cellular context [3]. To do it, first, we obtained 10 mammalian expression vectors encoding the sequences of proteins involved to DNA repair (PARP1, XRCC1, APE1, POLβ, Lig1, Lig3, TOP1, PP1α, PSPC1 and NONO) fused to the sequences of Tau (a microtubule-associated protein) and to the sequence of RFP. Then we

© E. M. Mamontova, M. V. Sukhanova, V. Joshi, O. I. Lavrik, D. Pastré, 2021
* The study is supported by RSF (project No. 20-14-00086).

performed a co-transfection of HeLa cells with both FUS-GFP-Tau vector and RFP-Tau vector containing the sequence of DNA-repair protein, fixed the cells and prepared the samples for fluorescence microscopy. Through their fusion to Tau the proteins are confined on microtubules and quantitative parameters defining their spatial segregation are measured along the microtubule network in cells.

We observed that two proteins PARP-1 and XRCC1 were mixed with FUS on microtubules. It means that these proteins can be brought to FUS-rich compartment whether through the direct interaction with FUS or through the interaction with PAR.

References

1. Rulten S. et al. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage // Nucleic Acids Research. 2014. Vol. 42(1). P. 307–314.

2. Singatulina A. S. et al. PARP-1 Activation Directs FUS to DNA Damage Sites to Form PARG-Reversible Compartments Enriched in Damaged DNA // Cell Reports. 2019. Vol. 27(6). P. 1809–1821.

3. Maucuer A. et al. Microtubules as platforms for probing liquid-liquid phase separation in cells — application to RNA-binding proteins // J. of Cell Science. 2018. Vol. 131(11).

ВЗАИМОСВЯЗЬ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА С АДИПОЦИТОКИНАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ*

М. И. Маркелова[1], Д. Р. Хуснутдинова[1], А. В. Лайков[1], А. М. Сенина[1], С. Р. Абдулхаков[1], Т. В. Григорьева[1], А. В. Шестопалов[2,3,4]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2] Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва
[3] Центр цифровой и трансляционной биомедицины «Центр молекулярного здоровья», Москва
[4] Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

E-mail: mimarkelova@gmail.com

Аннотация

В настоящее время известно, что адипоцитокины участвуют в регуляции воспаления, что позволяет предположить их роль в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Учитывая тот факт, что микробиота кишечника также вносит вклад в развитие данных заболеваний, мы установили ассоциации между бактериальным составом микробиоты и уровнем адипоцитокинов в крови пациентов с ВЗК.

Введение

ВЗК — болезнь Крона и язвенный колит (ЯК) — многофакторные тяжелые рецидивирующие заболевания, характеризующиеся специфическими изменениями микробиоты кишечника. Воспалительные реакции, локализующиеся в стенке кишечника, могут затрагивать и окружающую висцеральную жировую ткань, гипертрофия которой отмечается у пациентов с ВЗК. Жировая ткань в настоящее время рассматривается как сложный и метаболически активный эндокринный орган, продуцирующий адипоцитокины. Эта группа молекул включает в себя классические цитокины, факторы роста, белки гомеостаза глюкозы и др., участвующие в координации различных биологических процессов, включая иммунитет. Целью данной работы являлось выявление взаимосвязи адипоцитокинов сыворотки крови и состава микробиоты кишечника пациентов с ЯК.

Материалы и методы

Были собраны образцы кала и сыворотки крови от 30-ти пациентов с ЯК. Из образцов кала выделяли ДНК с последующим секвенированием ампликонов гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Ilumina, США). Биоинформатический анализ производили с помощью программы QIIME v. 1.9. Концентрацию 22 адипоцитокинов в сыворотке крови определяли с помощью мультиплексного набора для ИФА HCYTA-60K-PX48 (Millipore, США). Корреляционный анализ производили путем расчета коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты

Выявлены статистически достоверные отрицательные корреляции индекса альфа-разнообразия Шеннона микробиоты кишечника с уровнями IL-8, IL-10, TNFa и VEGF. Известно, что концентрация данных цитокинов в крови пациентов с ВЗК увеличивается с активностью заболевания, тогда как разнообразие микробиоты кишечника снижается, что согласуется с полученными нами данными. Также обнаружены положительные корреляции представленности филы Proteobacteria с IL-8, IL-10 и TNFa, и отрицательные — фил Firmicutes и Actinobacteria с IL-8. Представители нормальной микрофлоры — роды семейства *Lachnospiraceae, Ruminococcaceae и Erysipelotrichaceae* снижаются с ростом IL-8 и IL-10. Уровень резистина — одного из новых маркеров активности ВЗК — отрицательно коррелировал с представленностью нескольких родов порядков Bacteroidales и Clostridiales, тогда как BDNF, уровень которого повышается в крови у пациентов с ВЗК, растет вместе с представленностью семейства *Enterobacteriaceae*. Также обнаружено, что с ростом концентрации инсулина в крови снижается доля семейств *Erysipelotrichaceae, Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae.*

Выводы

Были выявлены ассоциации представленности отдельных групп бактерий и общего альфа-разнообразия микробиоты кишечника пациентов с ЯК с уровнями адипоцитокинов сыворотки крови. Раскрытие механизмов данной взаимосвязи может помочь выяснить молекулярные основы патогенеза ВЗК.

© М. И. Маркелова, Д. Р. Хуснутдинова, А. В. Лайков, А. М. Сенина, С. Р. Абдулхаков, Т. В. Григорьев, А. В. Шестопалов, 2021

* Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № 0671-2020-0058.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ДОСТАВКЕ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9*

К. И. Махалова[1,2], О. А. Семиколенова[1,2], М. И. Мещанинова[1,2], Д. С. Новопашина[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*

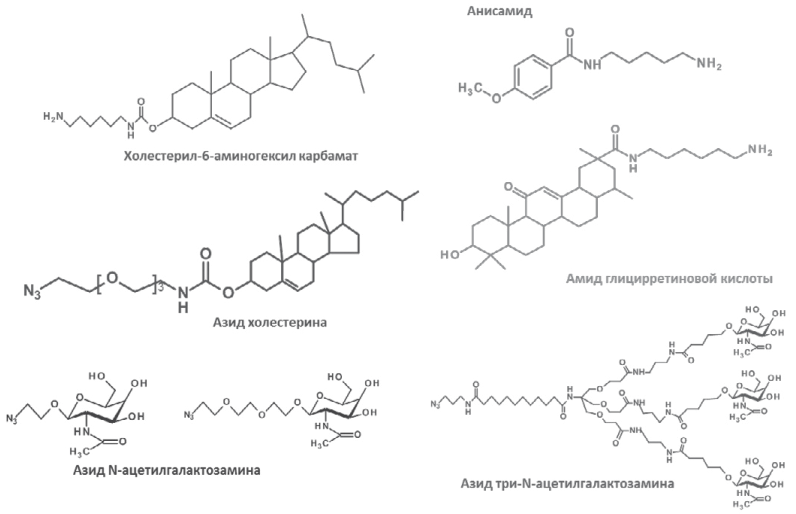
E-mail: ksenyamakhalova@gmail.com

Аннотация

Предложен подход к доставке направляющей РНК для системы CRISPR/Cas9 в клетки, основанный на использовании дополнительного олигонуклеотида, комплементарного направляющей РНК и содержащего группировки, способствующие проникновению комплекса в клетки. Для введения группировок использованы метод синтеза на твердой фазе и метод медь-катализируемого циклоприсоединения в растворе (метод «клик»-химии).

Геномное редактирование является универсальным инструментом молекулярной биологии и генетической инженерии и позволяет создавать уникальные линии клеток и организмы с заданными свойствами, а также в ближайшем будущем с большой вероятностью позволит осуществлять генетическую терапию. Для использования этой технологии необходима эффективная доставка компонентов системы геномного редактирования в клетки. Одним из перспективных подходов в этой области является использование доставляющих лигандов. В основе разрабатываемого нами подхода лежит введение в систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 дополнительного олигонуклеотида, модифицированного лигандами, облегчающими доставку в клетку.

Целью нашей работы является дизайн и синтез дополнительных доставляющих олигонуклеотидов и исследование их способности формировать комплексы с направляющими РНК, на примере crРНК, и проникать в клетки.



Структуры лигандов, облегчающих доставку олигонуклеотидных конструкций в клетку

Для введения анисамида или глицирретиновой кислоты был оптимизирован предложенный нами ранее твердофазный подход [1], основанный на использовании специально синтезированных амидов соответствующих кислот (см. рисунок). Для введения холестерина и остатков N-ацетилгалактозамина (GalNAc) использовали метод медь-катализируемого циклоприсоединения («клик»-химии), кроме того, холестерин вводили на твердой фазе с использованием специально синтезированного аминопроизводного холестерина (см. рисунок). Строение полученных конъюгатов доказывали методами масс-спектрометрии. Методами термической денатурации и задержки в геле продемонстрировано, что введение доставляющих лигандов, таких как холестерин, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), анисамид и глицирретиновая кислота, в состав олигонуклеотидов не ухудшает их способность образовывать комплексы с направляющей crРНК. Исследована способность комплексов направляющей crРНК с доставляющими олигонуклеотидами проникать в клетки. Созданные олигодезоксирибонуклеотиды способны блокировать направляющую РНК в составе CRISPR/Cas9 системы.

© К. И. Махалова, О. А. Семиколенова, М. И. Мещанинова, Д. С. Новопашина, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-51026.

Предложенный подход в сочетании с разработанной нами ранее фотоактивируемой системой CRISPR/Cas9 [2] позволит создать систему доставки с возможностью ее фотоконтролируемого включения.

Литература

1. Meschaninova M. I., Novopashina D. S., Semikolenova O. A. et al. Novel Convenient Approach to the Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates // Molecules. 2019. Vol. 24. No 23. P. 4266.

2. Ахметова Е. А., Голышев В. М., Вохтанцев И. П. и др. Фотоактивируемая система CRISPR/CAS9 // Биоорган. химия. 2021. Т. 47. № 2. С. 276–286.

ИЗУЧЕНИЕ ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДОГЕННЫХ УЧАСТКОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S1 В ЦЕЛЯХ СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ НАПРАВЛЕННОЙ БЕЛКОВОЙ АГРЕГАЦИИ *

А. В. Мачулин[1], С. Ю. Гришин[2], У. Ф. Джус[2], А. К. Сурин[2,3], О. В. Галзитская[2,4]

[1] *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»*
[2] *Институт белка РАН, Пущино*
[3] *Пущинский филиал Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*
[4] *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*

E-mail: and.machul@gmail.com

Аннотация

Многофункциональный рибосомный белок S1 является частью 30S субъединицы рибосомы и играет важную роль в инициации трансляции мРНК, участвует в элонгации, а также выполняет ряд внерибосомных функций. В данной работе мы объединили биоинформатические и экспериментальные подходы для изучения особенностей амилоидогенных областей в семействе бактериальных S1 белков. Для оценки склонности к образованию фибрилл был исследован набор данных, включающий 1331 последовательности белка S1. Для идентификации амилоидогенных областей в структурных доменах были использованы специализированные онлайн-инструменты: FoldAmyloid, Waltz, PASTA 2.0 и Aggrescan. Поиск, сбор, сопоставления, представления и анализ данных для исследуемой репрезентативной выборке были реализованы с помощью языка программирования Python 3. Результаты программ, использованных для предсказания амилоидогенных участков белков S1, сильно различаются. Программы PASTA 2.0 и Aggrescan не обнаружили четко определенных (со строгими границами) амилоидогенных участков вдоль белковой цепи. В то же время программы FoldAmyloid и Waltz предсказали определенные области с высокой склонностью к фибриллообразованию. Наличие строго ограниченных амилоидогенных участков (по программам FoldAmyloid и Waltz) для каждой дополнительной группы S1 доменов (содержащих разное количество структурных доменов) и между этими группами позволяет рассматривать эти участки как уникальные и наиболее актуальные для дальнейших экспериментальных исследований, изучения их склонности к фибриллообразованию. Доля амилоидогенных участков для полноразмерных белков снижается с увеличением размера белков. Внутри отдельных доменов амилоидогенные области чаще предсказываются на N- и C-концевых участках.

Для экспериментальной проверки были выбраны 11 предсказанных амилоидогенных пептида (длиной 10 а.а.), полученных для белков S1 из модельных организмов *T. thermophilus* и *E. coli,* а также четыре предсказанных амилоидогенных десятичленных пептида на основе белка S1 из *P. aeruginosa*. Исследуемые пептиды получены твердофазным синтезом. Для выбранных пептидов из *T. thermophilus* и *E. coli* методом электронной микроскопии была показана их способность формировать фибриллы. В то же время короткий белок (один отдельный домен) из этих организмов может вызывать характерное для амилоидов увеличение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т, формирует сфероподобные агрегаты, но не формирует фибриллы. Для пептидов, полученных на основе белка S1 из *P. aeruginosa* было показано, что все пептиды кроме одного образовывали амилоидные фибриллы. По данным электронной микроскопии мономерный белок S1 из *P. aeruginosa* формирует кольцевые структуры с диаметром около 5 нм, а также может формировать агрегаты и ассоциаты различных размеров.

Для удлиненных модифицированных пептидов R23L: RKKRRQRRRGGGGLHITDMAWKR и R23R: RKKRRQRRRGGGGITDFGIFIGL из белка S1 *P. aeruginosa*, проявивших антибактериальный эффект, была проверена коагрегация с полноразмерным белком. Было показано, что S1 *P. aeruginosa* и пептид R23L формируют агрегаты разного размера, а S1 *P. aeruginosa* и пептид R23R формируют агрегаты разного размера, фибриллы разного диаметра и пленки.

© А. В. Мачулин, С. Ю. Гришин, У. Ф. Джус, А. К. Сурин, О. В. Галзитская, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 18-14-00321 (О. В. Галзитская). Авторы благодарны О. М. Селивановой за проведение ЭМ-работ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (ПЦР-ТИПИРОВАНИЕ) ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ БЕЛАРУСИ*

Е. И. Машков, Е. С. Гайдученко, И. А. Крищук

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск

E-mail: mashkov.evgenii25@gmail.com

Аннотация

В статье приведены оригинальные данные молекулярно-генетического анализа (посредством ПЦР-типирования) широко распространенного на территории Беларуси вида мелких млекопитающих — обыкновенной полевки (*Microtus arvalis sensu lato*). Установлено, что все анализируемые особи криптической группы относятся к двум видам: *M. arvalis* формы «*arvalis*» и «*rossiaemeridionalis*», о чем свидетельствует амплифицированный фрагмент митохондриального гена *Cyt b* размером в 842 пар нуклеотидов (п.н.) и 469 п.н. соответственно.

В фауне Беларуси, по имеющимся данным, группа обыкновенных полевок — «*arvalis*» — представлена двумя видами: обыкновенная *Microtus arvalis* Pallas, 1779 (2*n*=46, NF=86) и восточноевропейская *Microtus rossiaemeridionalis* Ognev, 1924 (=*Microtus subarvalis, = epiroticus, =levis)* (2*n*=54, NF=56).

Более ранние исследования криптических видов *M. arvalis s.l.* на территории Беларуси проводились в 1980-е гг. с применением лишь цитогенетических методов [1, 2, 4]. В начале 2000-х гг., видовую идентификацию проводили с помощью морфометрических отличий [6; 7, 8], однако данные различия носят сугубо региональный характер и не могут экстраполироваться на весь ареал обитания видов-двойников.

Для расширения возможности таксономической дифференциации в данной группе мелких млекопитающих, присутствует необходимость применять различные генетические методы. Одними из таких методов для идентификации (диагностики) видов-двойников, является использование хромосомных и молекулярно-генетических маркеров.

Материалом для настоящей работы послужили данные, собранные на протяжении в 2017–2020 гг. с помощью живоловушек трапикового типа. В анализ включено 109 особей, отловленных в 21 пунктах центральной части Беларуси (см. таблицу). Учет проводился по стандартной методике методом ловушко-суток [**5**].

Для амплификации митохондриального гена *Cyt b* были использованы праймеры согласно методике ПЦР-типирования, для трех криптических видов: cbMO 604F (5'-CCTTCCACTTTATTCTACCT-3'), cbMA 842F (5'-GGGGTTTACTATGGCTCA-3'), cbMR 469F (5'-CAGTCAAAGACTTCTTAGGG-3'). Для ПЦР-типирования использовали смесь указанных выше праймеров с обратным праймером H15915-SP (5'-TTCATTACTGGTTTACAAGAC-3') [3].

У разных особей криптических видов, амплифицируется фрагмент митохондриального гена *Cyt b* разной длины. У особей формы *arvalis* амплифицируется фрагмент митохондриального гена *Cyt b* размером 842 пар нуклеотидов, у особей формы *obscurus* — 604 п.н., а у представителей *M. rossiaemeridionalis* амплифицируется фрагмент размером 469 п.н.

Согласно полученным данным Microtus arvalis формы «arvalis» выявлена во всех локалитетах исследования, а формы «rossiaemeridionalis» только в одном (таблица).

Численность идентифированных особей криптической группы, молекулярно-генетическим методом (ЦПР-типирование) в центральной части Беларуси

Номер п/п	Область: район (место)	N	Митотип (cyt b)
1	Брестская: Борисовский (пос. Приозерный)	3	AR
2	Витебская: Шумилинский (д. Яновиль)	5	AR
3	Витебская: Браславский (г. Браслав)	5	AR
4	Витебская: Верхнедвинский (г. Верхнедвинск)	4	AR
5	Минская: Вилейский (д. Ободовцы)	3	AR
6	Минская: Вилейский (д. Стахи)	3	AR
7	Минская: Воложинский (д. Белокорец)	10	AR
8	Минская: Воложинский (г. Воложин)	8	AR
9	Гродненская: Ивьевский (ур. Валеватка)	2	AR

© Е. И. Машков, Е. С.Гайдученко, И. А. Крищук, 2021

* Исследование поддержано грантом БРФФИ на 2020–2022 (проект Б20М-062 «Пространственно-биотопическая структура криптических видов обыкновенной полевки Microtus arvalis s. l. в центральной и западной Беларуси»).

Номер п/п	Область: район (место)	N	Митотип (cyt b)
10	Гродненская: Кореличский (д. Щорсы)	4	AR
11	Минская: Крупский (д. Колодница)	10	AR
12	Витебская: Лепельский (д. Кветча)	5	AR
13	Минская: Минский (д. Дубровка)	2	AR
14	Гомельская: Мозырский (д. Скрыгалов)	4	AR
15	Минская: Мядельский (пос. Нарочь)	10	AR
16	Гомельская: Петриковский (д. Конковичи)	5	AR
17	Гомельская: Светлогорский (д. Якимова Слобода)	6 в том числе	
		5	AR
		1	MR
18	Брестская: Столинский (д. Лядец)	10	AR
19	Минская: Стародорожский (г. Старые дороги)	10	AR
20	Брестская: Пинский (д. Плещицы)	2	AR
21	Гомельская: Житковичский (д. Борки)	4	AR

Примечание: AR — *M. arvalis* формы «*arvalis*», MR — *M. rossiaemeridionalis;* N — число особей.

Заключение

В центральной части Беларуси криптическая группа обыкновенных полевок представлена двумя видами: 46-хромосомная форма — *M. arvalis* и 54-хромосомная форма — *M. rossiaemeridionalis*.

Литература

1. Манохина Н. В. Хромосомный набор и таксономическое положение обыкновенной полевки Беларуси / Н. В. Манохина, В. Ф. Терехович // Вестн. Белорус, ун-та, 1979. Сер. 2. № 3. С. 7–68.

2. Манохина Н. В. Эколого-морфологическая характеристика обыкновенной полевки Беларуси / Н. В. Манохина. Минск: Ин-т зоологии АН БССР, 1981. 17 с.

3. Баскевич М. И. К распространению изменчивости видов-двойников Microtus arvalis s.l. (Rodentia, Arvicolinae) в Центральном Черноземье по хромосомным и молекулярно-генетическим данным / М. И. Баскевич и др. // Зоологический журнал. 2009. Т. 88. № 4. С. 473–487.

4. Терехович В. Ф. Особенности размножения обыкновенной полевки южной части Белоруссии в весенне-летний период / В. Ф.Терехнович, Н. В. Манохина, М. Б. Голубева. Вестн. Белорус, ун-та, 1981. Сер. 2. № 2. С. 39–41.

5. Кучерук В. В. Новое в методике количественного учета вредных грызунов и землероек / В. В. Кучерук // Организация и методы учета птиц и вредных грызунов. М.: Изд-во АН СССР, 1963. С. 159–184.

6. Сидорович В. Е. Ландшафтные различия структурной организации сообщества мелких млекопитающих и хищников — их потребителей в трансзональных лесных комплексах / В. Е. Сидорович, И. А. Соловей, М. М. Пикулик, Г. О. Лаужель // Весці НАН Беларусі. Сер. Біял. нав. 2003. № 3. С. 88–102.

7. Савицкий Б. П. Млекопитающие Беларуси / Б. П. Савицкий, С. В. Кучмель, Л. Д. Бурко // Под ред. Б. П. Савицкого. Минск: Белорусский государственный университет, 2005. 317 с.

8. Блоцкая Е. С. Популяционная экология мелких млекопитающих юго-западной и центральной Беларуси / Е. С. Блоцкая, В. Е. Гайдук // Брест: Изд-во БрГУ, 2004. 187 с.

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ*

М. М. Меламуд, В. Н. Бунева, Е. А. Ермаков

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: Marken94@Mail.Ru

Аннотация

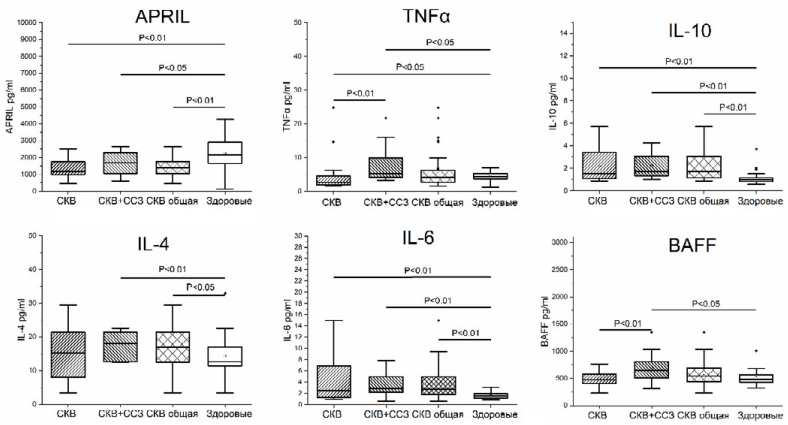
В работе проанализировано изменение цитокинового профиля у больных системной красной волчанкой (СКВ) в зависимости от наличия сопутствующих заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССЗ). В работе показано влияние сопутствующих ССЗ на уровни цитокинов у больных СКВ по сравнению с контрольными группами больных СКВ без ССЗ и здоровых людей. В исследовании продемонстрировано, что уровни TNFα и IL-4 существенно зависят от сопутствующего ССЗ.

Материалы и методы

В исследование включены 29 препаратов сыворотки крови пациентов с диагнозом СКВ (14 без ССЗ, 15 с подтвержденным ССЗ) и 37 препаратов здоровых доноров. Среди ССЗ встречались: артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и хроническая сердечная недостаточность. Концентрацию цитокинов определяли мультиплексным анализатором MAGPIX (Luminex, США) с использованием набора Human Premixed Multi-Analyte Kit Luminex Assay (R&D Systems, США). В рамках данной работы проанализированы следующие цитокины IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IFNα, TNFα, BAFF (B-cell activating factor), APRIL (A proliferation-inducing ligand). Диагнозы СКВ и ССЗ устанавливались на основании анамнеза и клинических данных. Для верификации диагноза СКВ использовался индекс SELENA-SLEDAI. Статистическая обработка результатов проводилась в программах STATISTICA 10 и OriginPro 2021.

Результаты

В общей группе больных СКВ по сравнению со здоровыми донорами значимо ($P \leq 0,05$) изменились следующие цитокины (медианное значение СКВ общая группа: здоровые (пг/мл)): IL-4 (16,93 : 12,58), IL-6 (2,65 : 1,51), IL-10 (1,70 : 1,01), APRIL (1540 : 2162). Причем APRIL изменился в меньшую сторону. В группе больных СКВ без ССЗ по сравнению со здоровыми донорами значимо ($P \leq 0,05$) увеличивалась концентрация IL-10 (1,53 : 1,01) в сыворотке, но в тоже время уменьшались концентрации TNFα (3,11 : 4,42), IL-2 (5,82 : 7,46), IL-1β (3,55 : 4,17) и APRIL (1233 : 2162). В группе больных СКВ с ССЗ по сравнению со здоровыми донорами значимо ($P \leq 0,05$) из-



Сывороточные уровни цитокинов, изменявшихся в зависимости от исследованной группы: горизонтальные линии соединяют группы, данные в которых различались согласно U-критерию Манна — Уитни. За достоверное различие принималось $P \leq 0,05$

© М. М. Меламуд, В. Н. Бунева, Е. А. Ермаков, 2021

* Исследования выполнены при поддержке базового проекта ПФНИ ГАН № АААА-А17-117020210023-1, а также грантом РНФ № 20-15-00162.

менились следующие цитокины: IL-4 (16,93 : 12,58), IL-6 (2,84 : 1,51), IL-10 (1,73 : 1,01), TNFα (7,91 : 4,42) и BAFF (642 : 482,05). Уровень всех цитокинов оказался выше у пациентов с СКВ. В группе больных СКВ без ССЗ по сравнению с больными СКВ с ССЗ значимо ($P \leq 0,05$) изменились следующие цитокины: TNFα (3,11 : 7,42), APRIL (1151 : 1688) и BAFF (472,97 : 642,00). Концентрация цитокинов была выше в группе больных СКВ с ССЗ.

Выводы

При сравнении общей группы СКВ со здоровыми донорами выявлено повышение IL-4, IL-6, IL-10, что согласуется с литературными данными и обусловлено стимуляцией Т-клеток в цепи патогенеза СКВ. Однако, при детальном рассмотрении уровня цитокинов в зависимости от сопутствующей сердечно-сосудистой патологии, выявлен эффект ССЗ на цитокиновый профиль при СКВ. В частности, концентрация IL-4 увеличивается в общей группе больных СКВ за счет вклада больных с ССЗ. Можно предположить, что сопутствующее ССЗ при СКВ способствует изменению цитокинового профиля, а также приводит к неправильной интерпретации результатов в исследованиях, в которых не учитывается фактор сопутствующего ССЗ. Так, в данном исследовании показано, что в общей группе больных СКВ уровень TNFα не отличается от группы здоровых доноров, но при разделении группы больных СКВ в зависимости от сопутствующего ССЗ показано значимое увеличение в группе пациентов с ССЗ и уменьшение в группе больных СКВ без ССЗ.

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИНДУКЦИИ МИКРОЯДЕР, ХРОМОСОМНЫХ МОСТОВ И АПОПТОЗА НА ОСНОВЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ*

И. М. Михайлов, А. А. Мурашкина, В. В. Киселев, Л. В. Ахальцева,
Ф. И. Ингель, Т. А. Никитина, М. А. Коняшкина, Г. А. Шипулин

ФГБУ «ЦСП» ФМБА РФ

E-mail: IMkhaylov@cspmz.ru

Аннотация

Подсчет микроядер для выполнения микроядерного теста для исследования хромосомных аберраций является трудозатратным и субъективным методом исследования мутационной нагрузки. В данной работе приводится решение в виде алгоритма на основе нейронной сети для автоматической обработки изображений, полученных в ходе проведения исследования микроядер и хромосомных мостов методами оптической микроскопии и предсказания количества и локализации исследуемых элементов.

Исследование индукции образования микроядер и хромосомных мостов является стандартным методом анализа хромосомных аберраций. Анализ и подсчет количества указанных элементов осуществляется вручную, с использованием метода оптической микроскопии. Подобные исследования являются трудоемкими, а также, в значительной мере подвержены возникновению ошибок, опосредованных человеческим фактором.

В данной работе было создано решение на основе нейронных сетей для анализа изображений клеток, содержащих микроядра, хромосомные мосты, а также клетки в состоянии апоптоза. В качестве объекта исследования использовалась коллекция изображений лимфоцитов периферической крови человека, как содержащих микроядра или хромосомные мосты, так и не содержащих. Коллекция изображений была собрана с 2016 по 2021 гг. и насчитывает 893 фотографии. Для каждой фотографии были собраны метаданные для создания обучающей выборки. Метаданные были представлены в двух вариантах: количество микроядер и/или хромосомных мостов на изображении (далее — метаданные первого типа), координаты микроядер и/или мостов на изображении (далее — метаданные второго типа). Кроме того, для изображений, содержащих клетки в состоянии апоптоза был введен дополнительный флаг.

Алгоритм состоит из модуля препроцессинга изображений, осуществляющий цветокоррекцию, а также коррекцию размера входных изображений, а также перевод изображений в тензорное представление. Далее модуль создания обучающей и тестовой выборок формирует тензор запроса X и тензор ответов y. Проводится обучение с учителем, правильные ответы для метаданных первого типа представлены в виде one-hot encoded вектора. Для оценки корректности работы алгоритма была проведена кросс-валидация. Была проведена оптимизация глубины нейронной сети, формы input и output каждого слоя, положений Flatten-слоя, а также функций активации каждого слоя.

Были оценены функции оптимизации нейронной сети (SGD, Adam, Adadelta, Nadam и пр.), а также функции потерь (кроссэнтропия, бинарная кроссэнтропия). Было проведено сравнение сверточной и рекуррентной нейронных сетей. Для всех исследуемых параметров нейронной сети были оценены чувствительность и специфичность предсказаний для каждого из типов метаданных, а также построены AUC-ROC кривые. Для ускорения работы алгоритма поддерживается возможность исполнения пайплайна на GPU с использованием программно-аппаратной архитектуры параллельных вычислений CUDA. Чувствительность разработанного алгоритма на исследуемой выборке составила 84 %.

В результате работы был создан пайплайн, для анализа количества и локализации микроядер, хромосомных мостов и клеток в состоянии апоптоза при проведении микроядерного теста, что позволит оптимизировать проведение микроядерного теста. Разработанный алгоритм включает в себя модуль препроцессинга изображений в автоматическом режиме, модуль создания обучающей и тестовой выборок, сверточную нейронную сеть, а также модуль сбора статистики и анализа.

© И. М. Михайлов, А. А. Мурашкина, В. В. Киселев, Л. В. Ахальцева, Ф. И. Ингель, Т. А. Никитина, М. А. Коняшкина, Г. А. Шипулин, 2021

* Работа выполнена в рамках проекта государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА РФ (номер государственного учета в ЕГИСУ НИОКТР АААА-А20-120111090100-6).

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PR-1 PINUS SYLVESTRIS*

Л. В. Можаровская

Институт леса НАН Беларуси, Гомель

E-mail: milamozh@yandex.ru

Аннотация

Для проростков *Pinus sylvestris*, выращенных в условиях заражения *Fusarium sp*., установлена патоген-индуцированная экспрессия PR-генов. В данной работе представлены данные структурно-функционального анализа транслируемого полипептида транскрипта семейства PR-1 генов.

Одними из основных компонентов системной приобретенной устойчивости (SAR) растений являются полипептиды, ассоциированные с процессами патогенеза (PR-белки). В нашем исследовании проводилась идентификация патоген-индуцированных PR-генов *Pinus sylvestris*. Для этого в условиях опыта (при сохранении контроля) проводилось заражение *Fusarium sp.* проростков *P. sylvestris*. Ткани корня и гипокотиля использовали для получения препаратов мРНК, высокопроизводительное секвенирование транскриптомов выполняли на базе Ion Torrent.

В ходе исследования для патосистемы *Pinus sylvestris — Fusarium sp.* показана активация системной индуцированной устойчивости, путем повышенной экспрессии генов, кодирующих PR-белки семейств: PR-1, PR-3, PR-4, PR-5, PR-6, PR-9, PR-10, PR-19. При количественном анализе экспрессионной активности максимальным значением повышения уровня экспрессии (в 49,5 раз), по отношению к контролю, характеризовались транскрипты группы EST-локусов PR-1, кодирующих белки с выраженными фунгицидными свойствами.

При сравнительном анализе наиболее представленного PR-1 транскрипта (96 % от общего числа) в базе NCBI было показано отсутствие аннотированных последовательностей для *Pinus*. Отмечено наибольшее сходство (≈86 %) нуклеотидной последовательности транскрипта с мРНК *Picea glauca* (ID: BT110131.1), **транслируемой аминокислотной** последовательности (≈82 %) с полипептидом *Picea sitchensis* (ID: ABR18381.1). Анализ нуклеотидной последовательности PR-1 транскрипта в базе консервативных доменов NCBI показал, что кодируемый полипептид содержит в своей структуре один функциональный CAP-домен (cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins).

Моделирование третичной структуры полипептида PR-1 *P. sylvestris* выполнялось в программе SWISS-MODEL (референсная молекула — белок P14a *Solanum lycopersicum*, ID: 1cfe.1). Как видно из рис. 1, предсказанная модель CAP-домена PR-1-белка *P. sylvestris* включает в своем составе четыре α-спирали и β-цепи (короткую β1; β2, β5, β6, образующих β-лист; короткие β3 и β4, формирующих β-шпильку). На N-конце модели полипептида отмечено наличие гидрофобной сигнальной последовательности, на C-конце выявлен консервативный мотив PxGNxxxxxPY (рис. 2). Данный тип мотива

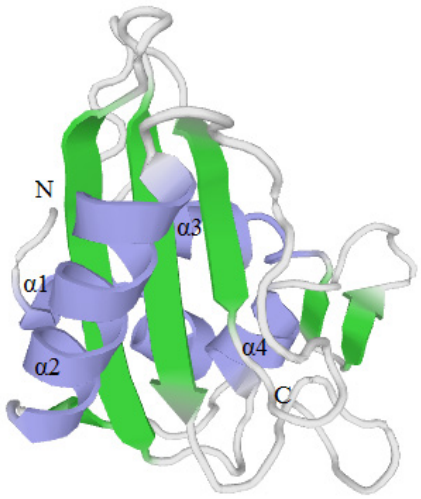


Рис. 1. Модель третичной структуры PR-1 белка *Pinus sylvestris*: α1–α4 — спирали выделены сиреневым цветом; β-цепи выделены зеленым цветом

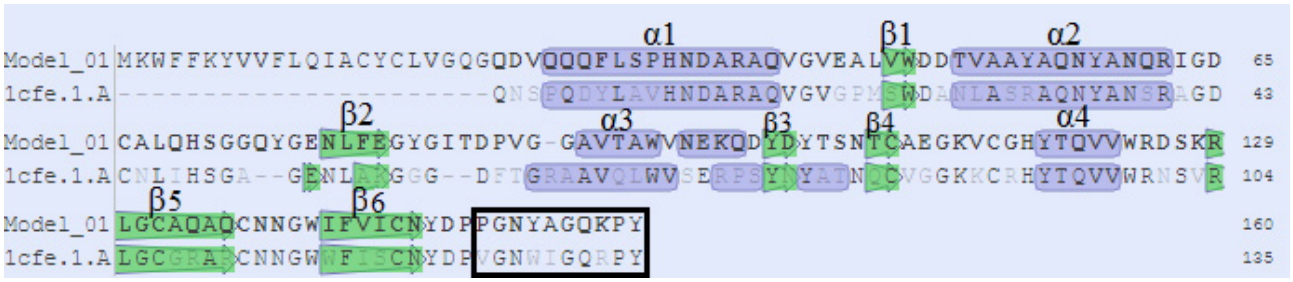


Рис. 2. Схема вторичной структуры PR-1 белка *Pinus sylvestris* (мотив PxGNxxxxxPY выделен в рамке)

© Л. В. Можаровская, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке БРФФИ в рамках научного проекта № Б20М-015.

ранее описан для PR-1 белка томата как производный от CAP1-подобной последовательности, выполняющий функцию элиситора в системе индуцированного защитного ответа растений [1].

Участие в молекулярных механизмах формирования устойчивости к патогенным микроорганизмам мотива PxGNxxxxxPY, было показано и для белков семейства PR-1 шелковицы (*Morus nigra* L.) [2].

Полученные нами данные о патоген-индуцированной экспрессии PR-1 генов и структурно-функциональной организации белков PR-1 семейства представляют новую информацию о механизмах устойчивости сосны обыкновенной к микромицетам рода *Fusarium*.

Литература

1. Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signaling in tomato / Y. L. Chen et al. // The Plant Cell. 2014. Vol. 26. No 10. P. 4135–4148.

2. Expression and functional analysis of a PR-1 Gene, MuPR1, involved in disease resistance response in mulberry (Morus multicaulis) / L. J. Fang et al. // J. of Plant Interactions. 2019. Vol. 14. No 1. P. 376–385.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА В КЛЕТКАХ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА*

Д. Д. Недорезова[1], Т. В. Васильева[1], Д. М. Колпащиков[1,2]

[1] *Международный институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[2] *Университет центральной Флориды, Орландо, США*

E-mail: nedorezova@scamt-itmo.ru

Аннотация

В данной работе представлены результаты исследования активности двух ДНК-конструкций: 1) бинарного антисмыслового олигонуклеотида (АСО) (АСОа/АСОб) и 2) ДНК-наномашины (ДНМ) на его основе в клетках хронического миелоидного лейкоза. Обе конструкции представляли собой АСО, разделенный на две части, с целью активации терапевтической функции только в присутствии маркера. Было обнаружено, что эффективность подавления экспрессии целевого гена при помощи обеих ДНК-конструкций была около 20 %, что вдвое ниже эффективности исходного АСО.

На сегодняшний момент технология на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) является наиболее изученным генно-терапевтическим подходом, который обладает высокой эффективностью, но при этом недостаточной селективностью, опосредованной подавлением целевых транскриптов не только в опухолевых клетках, но и в здоровых тканях. Для решения данной проблемы нашей научной группой было предложено разработать ДНК-наномашину (ДНМ) на основе АСО, способную активировать РНКаза Н-зависимое расщепление целевых генов только в присутствии опухолевых маркерных последовательностей.

Исходный АСО был разделен на две части (АСОа/АСОб), к которым были присоединены участки ДНК, распознающие маркерную РНК. АСОа/АСОб были сконструированы в форме ДНК-шпилек, способных раскрываться и активировать РНКаза Н-зависимое расщепление только в присутствии маркера. Далее была разработана ДНМ на их основе, в которой РНК-связывающие участки удерживались в едином ДНК-каркасе и высвобождались только в присутствии маркера. Разработанные конструкции были нацелены на подавление экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) в присутствии фрагмента мРНК протоонкогена KRAS. Для защиты от деградации внутриклеточными нуклеазами разработанные цепи АСОа/АСОб, ДНМ и синтетический фрагмент мРНК KRAS были синтезированы с тиофосфатными и 2'-О-метильными (2'-OMe) химическими модификациями.

В качестве объекта исследования использовались клетки хронического миелоидного лейкоза с встроенной плазмидой GFP (K562/GFP). АСОа/АСОб и ДНМ доставлялись в клетки в присутствии или отсутствии синтетического фрагмента мРНК KRAS-2'-OMe при помощи Lipofectamine 2000. Эффективность подавления экспрессии GFP была оценена по снижению внутриклеточной флуоресценции при помощи проточной цитофлуориметрии.

В результате проведенного исследования было обнаружено, что разработанные АСОа/АСОб и ДНМ обладают эффективностью подавления внутриклеточной флуоресценции 24 и 21 %, соответственно, от популяции клеток с нормальной морфологией, что вдвое ниже эффективности исходного АСО (40 %). Однако, эта активность не была селективной и не зависела от присутствия маркерной последовательности. В дальнейшем планируется протестировать цепи АСОа/АСОб с более стабильной вторичной структурой ДНК-шпильки и ДНМ с более стабильным присоединением РНК-связывающих участков, с целью снижения их эффективности в отсутствие маркера.

© Д. Д. Недорезова, Т. В. Васильева, Д. М. Колпащиков, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90071.

РЕАКЦИЯ ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА НА ВВЕДЕНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА-В ПОСЛЕ СЕЛЕКТИВНОЙ СУБДИАФРАГМАЛЬНОЙ ВАГОТОМИИ

Е. Э. Нестерко, А. С. Дятлова

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

E-mail: nesterko.elizaveta@yandex.ru

Аннотация

Изучение молекулярных механизмов и путей взаимодействия нервной и иммунной систем является актуальной задачей современной нейроиммунофизиологии. Орексинергическая система мозга участвует в механизмах регуляции иммунной системы, диалог между которыми реализуется и через вегетативные нервы, в том числе *n. vagus*. В настоящей работе исследованы реакции орексинергической системы, возникающие при интраперитонеальном введении антигена после селективной субдиафрагмальной ваготомии (ССВ).

В составе блуждающего нерва содержится 80 % афферентных волокон. На мембране парасимпатических нервов и их окончаний экспрессируются рецепторы к цитокинам — мессенджерам информации от иммунной системы к нервной [1]. Орексинергическая система мозга активируется при введении антигена [2]. Целью работы явилось определение степени активации орексин-содержащих нейронов гипоталамуса при интраперитонеальном введении стафилококкового энтеротоксина-В (SEB) после ССВ.

Работа выполнена на 16 самцах крыс линии Wistar (200–250 г), разделенных на экспериментальные группы — животные после: ССВ и интраперитонеального введения SEB; введения SEB, ССВ и введения PBS; введения PBS. Ваготомию проводили путем иссечения правой ветви *n. vagus* ниже диафрагмы в области пищевода. Через 5 дней интраперитонеально вводили SEB в дозе 500 мкг/кг. Спустя 4 ч после введения антигена животных выводили из эксперимента путем транскардиальной перфузии физиологическим раствором и 0,4 % формалином для последующего выделения и фиксации головного мозга. Изготавливали криостатные срезы гипоталамуса и, после иммуногистохимического окрашивания, проводили анализ его результатов. Количество орексин-позитивных нейронов и уровень оптической плотности их окраски определяли с помощью ПО ВидеоТест Морфология 5.2. Для статистической обработки данных использовали двухфакторный дисперсионный анализ в ПО GraphPad Prism.

Установлено увеличение количества орексин-позитивных нейронов у крыс, которым вводили SEB, по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 1). Влияния ваготомии на количество орексин-позитивных нейронов выявлено не было.

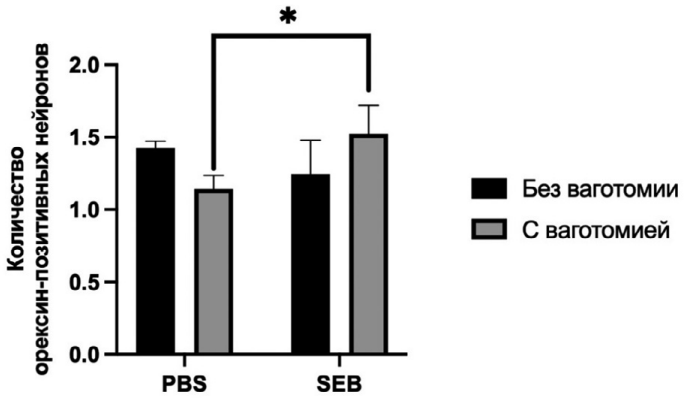


Рис. 1. Количество орексин-позитивных нейронов в гипоталамусе крыс после введения SEB и ваготомии: 27-й уровень мозга [4]; * — $p < 0,05$

Отмечено повышение уровня оптической плотности окраски орексин-позитивных нейронов у ваготомированных крыс после введения SEB ($p < 0,05$) (рис. 2).

© Е. Э. Нестерко, А. С. Дятлова, 2021

Таким образом, продемонстрировано изменение активности орексинергической системы гипоталамуса после введения SEB, выражающееся в увеличении количества орексин-содержащих нейронов. Влияния ваготомии не было обнаружено. Вероятно, сигнал об антигене мог достигать структур мозга через другие волокна блуждающего нерва, а также по второстепенным путям.

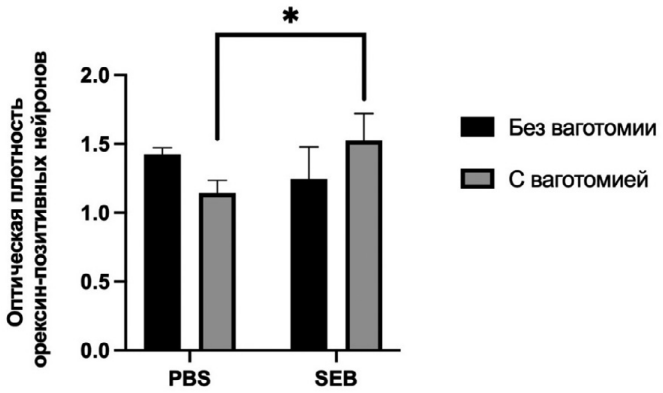


Рис. 2. Уровень оптической плотности орексин-позитивных нейронов в гипоталамусе крыс после введения SEB и ваготомии: 27 уровень мозга [4]; * — $p < 0,05$

Повышение уровня оптической плотности окраски орексин-содержащих нейронов свидетельствует об их активации при введении SEB на фоне ССВ. Увеличение содержания орексина А в нейронах может быть связано либо с его повышенной продукцией в клетках на фоне проведенных воздействий, либо с замедленной секрецией данного нейропептида [5].

Литература

Mazzone S. B. Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease // Physiological Reviews. 2016. Vol. 96(3). P. 975–1024.

Gaykema R. P. Lipopolysaccharide suppresses activation of the tuberomammillary histaminergic system concomitant with behavior: a novel target of immune-sensory pathways // Neuroscience. 2008. V. 152(1). P. 273–287.

Yuan H. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part I. Headache // J. of Head and Face Pain. 2015. V. 56(1). P. 71–78.

Swanson L. W. Brain maps: Structure of the rat brain. A laboratory guide with printed and electronic templates for data, models and schematics (3rd ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. 2004.

Kaeser P. S., Regehr W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release // Annual review of physiology. 2014. V. 76. P. 333–363.

СИНТЕЗ МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ БЕЛОК GFP, И ДОСТАВКА МРНК С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ*

Л. А. Орлова, Д. Н. Кисаков, В. Р. Литвинова, А. А. Фандо, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко

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

E-mail: orlova_la@vector.nsc.ru

Аннотация

Были отработаны условия получения мРНК-GFP с помощью РНК-полимеразы фага Т7, с использованием ДНК матрицы phMGFP, кодирующей зеленый флуоресцентный белок. Был отработан метод электропорации мышей линии Balb/c *in vivo* полученной мРНК.

Вакцины на основе мРНК представляют собой многообещающую альтернативу традиционным вакцинам из-за их высокой эффективности, возможности быстрой разработки и недорогого производства. Однако применение мРНК-вакцин до недавнего времени ограничивалось нестабильностью и неэффективностью их доставки *in vivo*. Введение мРНК с помощью электропорации может помочь преодолеть эти проблемы и использоваться в генной терапии и вакцинах для животных и человека

Целью исследования являлось получение мРНК, кодирующей белок GFP, и отработка условий доставки мРНК с помощью электропорации.

Отработку метода получения мРНК проводили с использованием в качестве матрицы плазмиды phMGFP, несущей ген зеленого флуоресцентного белка под контролем промотора фага Т7. Плазмидная матрица phMGFP была наработана, линеаризована и очищена. Для получения мРНК-GFP использовали Т7 полимеразу (СибЭнзим), транскрипцию мРНК проводили с использованием трифосфатов, добавлением химического аналога кэпа $m_2^{7'3'-O}GP_3G$ (ARCA Cap-Analog, Jena Bioscience) и заменой уридина на псевдоуридин. Полиаденилирование проводили с помощью набора A-Plus™ Poly(A) Polymerase Tailing Kit (CellScript).

Функциональность полученной мРНК-GFP оценивали путем трансфекции клеточной культуры HEK293T с использованием Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) *(in vitro)* и с помощью электропорации мышей линии Balb/c *(in vivo)* с использованием электропоратора CUY21 EDIT II (BEX Co).

После трансфекции клеточной культуры флюоресценцию белка GFP оценивали на 2-й день с помощью флуоресцентного микроскопа. Эффективность трансфекции составляла 70 %, что говорит об успешном биосинтезе белка с синтезированной мРНК.

Для проверки работы мРНК-GFP *in vivo*, ее вводили методом электропорации внутримышечно самкам мышей линии Balb/c весом 16–18 г. с применением прямоугольных импульсов постоянного напряжения прямой и обратной полярности. При этом использовались три импульса с напряжением 35 В и ограничением по силе тока в 70 мА, длительностью 30 мс и временем между импульсами 970 мс. В случае использования метода электропорации *in vivo*

На 21-й день после электропорации был проведен срез мышечной ткани в месте укола (в задней бедренной мышце) и выявлено интенсивное свечение GFP с помощью флуоресцентного микроскопа. Это также может свидетельствовать о том, что мРНК-GFP способна обеспечивать биосинтез белка *in vivo* в организме животных.

Таким образом, были отработаны условия получения мРНК, с использованием ДНК матрицы pcDNA-GFP. Отработан метод электропорации мРНК-GFP *in vivo* на модели мышей линии Balb/c.

© Л. А. Орлова, Д. Н. Кисаков, В. Р. Литвинова, А. А. Фандо, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2021

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ЭВОЛЮЦИЯ СЕМЕЙСТВ ГЕНОВ У МЕДУЗ *AURELIA SPP.* И ИХ РОЛЬ В ОНТОГЕНЕЗЕ*

А. Д. Патрикеев[1,3], Ф. Е. Гусев[1,3], А. П. Григоренко[1,3], Е. И. Рогаев[1,2,3]

[1] *Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва*
[3] *Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*

E-mail: patrikeev.ad@gmail.com

Аннотация

Для некоторых видов сцифоидных медуз Aurelia spp. был описан уникальный феномен обратного развития медузы в полип. Для изучения молекулярных основ этого процесса была проведена de novo сборка транскриптомов *Aurelia spp*. на основе данных транскриптомного секвенирования различных стадий их жизненного цикла. Используя биоинформатические методы анализа эволюции семейств генов были выявлены семейства со значимыми изменениями числа входящих в них генов. Для ряда генов этих семейств было показано изменение профиля экспрессии при обратном развитии *Aurelia spp*.

Дупликации и потери генов в ходе эволюции могут приводить к изменению морфологических и физиологических признаков организмов. Происходящие при этом расширения и сужения семейств генов могут соответствовать процессам адаптации вида к условиям среды обитания. *Aurelia spp*. являются сцифоидными медузами и обладают жизненным циклом, включающим полипоидную и медузоидную стадии, между которыми возможен прямой переход путем стробиляции. Для некоторых видов *Aurelia* был также описан уникальный процесс обратного развития медузы в полип. Для определения генов, отвечающих за эти и другие свойства *Aurelia spp.*, с использованием ранее полученных нами данных секвенирования транскриптомов различных стадий развития этих медуз, была проведена *de novo* сборка транскриптомов и анализ эволюции семейств генов *Aurelia spp*. В результате исследования были выявлены семейства со значимыми изменениями числа входящих в них генов. Например, обнаружено увеличение числа генов семейства олигопептидаз, имеющих гомологию с генами *THOP1* и нейролизина *NLN* человека. Для ряда генов этого семейства показан повышенный уровень экспрессии у эфир и при обратном развитии *Aurelia spp.* Таким образом, интеграция геномных и транскриптомных данных позволила выявить гены, которые могут отвечать за особенности онтогенеза *Aurelia spp.*

© А. Д. Патрикеев, Ф. Е. Гусев, А. П. Григоренко, Е. И. Рогаев, 2021

* Исследование выполнено при поддержке НТУ «Сириус» и РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-5101.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИПИДНОГО ПРОФИЛЯ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ВЫСШЕЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ *

С. И. Пеков[1,2], А. А. Сорокин[2], А. А. Кузин[2], Д. С. Бормотов[2], Д. С. Заворотнюк[2], В. А. Шурхай[2,3], И. А. Попов[2]

[1] Сколковский институт науки и технологий, Москва
[2] Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[3] Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко, Москва

E-mail: stanislav.pekov@forwe.ru

Аннотация

Малигнизация глиальных клеток приводит к существенному изменению их метаболизма за счет ускорения выработки структурных липидов клеточных мембран, необходимых для быстрого роста опухоли. Исследование глиальных опухолей человека затруднено низкой доступностью биоматериала в связи с малым объемом иссекаемых тканей, поэтому большинство исследований, посвященных липидному метаболизму глиальных опухолей выполняется на клеточных культурах и животных моделях. Однако, подобные модели не в полной мере отражают биологическую вариабельность опухолевых клеток и их окружение. Методы молекулярного профилирования, разрабатываемые, в свою очередь, для инструментального сопровождения нейрохирургических вмешательств, позволяют получать информацию об основных изменения липидного профиля иссекаемых тканей непосредственно в момент операции.

В данной работе приводится анализ результатов молекулярного профилирования иссекаемых тканей у пациентов с глиальными опухолями высшей степени злокачественности (CNS Grade IV). Молекулярные профили были получены при помощи прямого масс-спектрометрического анализа методом ICE-MS. Идентификация липидов проводилась с помощью ВЭЖХ-МС/МС.

Анализ образцов, полученных от 36 пациентов, позволил учесть естественную биологическую вариабельность клеток центральной нервной системы и провести исследование изменений липидного профиля в глиальных опухолях человека. В результате, были определены фосфолипиды, чье содержание в ткани изменяется в процессе малигнизации глиальных клеток. Эти изменения связаны как с изменением биодоступности различных жирных кислот вследствие гиповаскуляризации, так и с активизацией процессов бета-окисления и синтеза липидов, сопровождающих развитие эффекта Варбурга. Также были обнаружены и идентифицированы липиды, характеризующие изменение метаболических путей под действием характерной для глиальных опухолей мутации изотцитратдегидрогеназы-I.

© С. И. Пеков, А. А. Сорокин, А. А. Кузин, Д. С. Бормотов, Д. С. Заворотнюк, В. А. Шурхай, И. А. Попов, 2021

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-00337-20-02, проект № 0714-2020-0006), с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ХФ им. Н. Н. Семенова РАН.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TP53 И MDM2 В ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ГЛИОМ*

А. О. Пенькова, Н. В. Гончаров, М. Е. Шмелев, В. М. Жменя, И. Н. Бакланов, В. С. Гулая, В. В. Кумейко

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток
Лаборатория биомедицинских клеточных технологий

E-mail: penkova-ao@students.dvfu.ru

Аннотация

Нервная система — одна из наименее распространенных локализаций онкологических заболеваний, однако в структуре смертности от злокачественных новообразований рак мозга и других отделов ЦНС занимает второе место в возрастных группах младше 40 лет. В 2019 г. 20,8 % смертей онкологических больных в возрасте до 29 связаны с опухолями мозга [1].

Ген TP53 кодирует белок p53, подавляющий пролиферацию опухолевых клеток [2]. Он является важным транскрипционным фактором и регулирует такие базовые процессы, как клеточный цикл, апоптоз и дифференцировку. Онко-ассоциированные варианты TP53 встречаются в 50 % злокачественных новообразований человека [3], однако в нейробластомах распространен ген дикого типа [4]. TP53 находится под контролем своего антагониста MDM2, гиперэкспрессия которого наблюдается в раковых клетках мозга [5].

Данная работа посвящена изучению изменений транскрипции генов TP53 и MDM2 в первичных клеточных линиях глиом в условиях гиперэкспрессии TP53. Так как MDM2 является мишенью для p53, их взаимодействие происходит по принципу отрицательной обратной связи: MDM2 предотвращает накопление p53, что снижает транскрипцию MDM2. Одной из перспективных терапевтических стратегий является использование ингибиторов MDM2 и снижение его экспрессии для восстановления функций p53 дикого типа [6, 7].

Целью данной работы является изучение изменений в уровне экспрессии MDM2 в ответ на усиление транскрипции TP53.

Материалами послужили первичные клеточные линии глиом дикого типа. Гиперэкспрессия TP53 была вызвана лентивирусным вектором, имеющим флуоресцентный репортер. Изменения в уровне экспрессии генов оценивалась при помощи количественной ПЦР. В качестве референсного гена был использован CSNK2B.

Результаты исследования

В качестве пробного эксперимента мы провели оценку экспрессии генов после трансдукции для определения диагностического окна, во время которого происходит гиперэкспрессия и возможно детектировать исследуемые транскрипты. Флюоресценция, подтверждающая работу внесенной конструкции, сохранялась в течение 28 дней (рис. 1), при этом наблюдалось снижение пролиферации и остановка клеточного цикла.

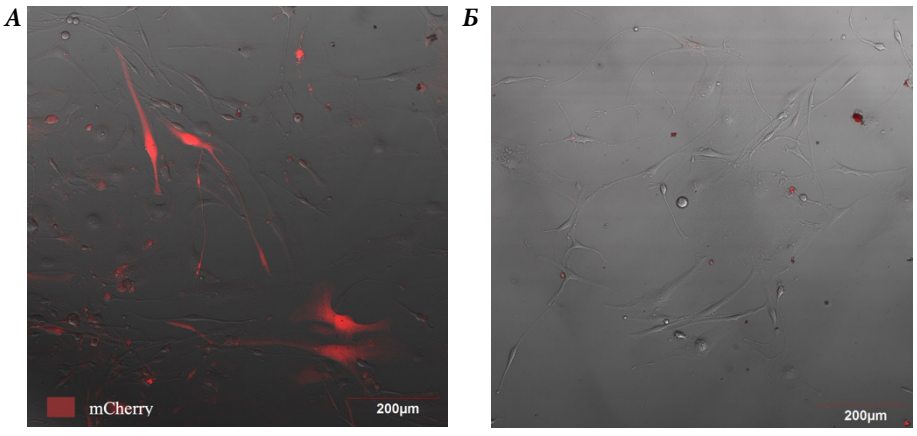


Рис. 1. Визуализация экспрессии TP53 флуоресцентным репортером t2a-mCherry:
А — трансдуцированные клетки; *Б* — негативный контроль

Результаты исследования приведены на графиках (рис. 2, 3).

© А. О. Пенькова, Н. В. Гончаров, М. Е. Шмелев, В. М. Жменя, И. Н. Бакланов, В. С. Гулая, В. В. Кумейко, 2021

* Исследование финансировалось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0657-2020-0004 и гранта РНФ № 20-15-00378.

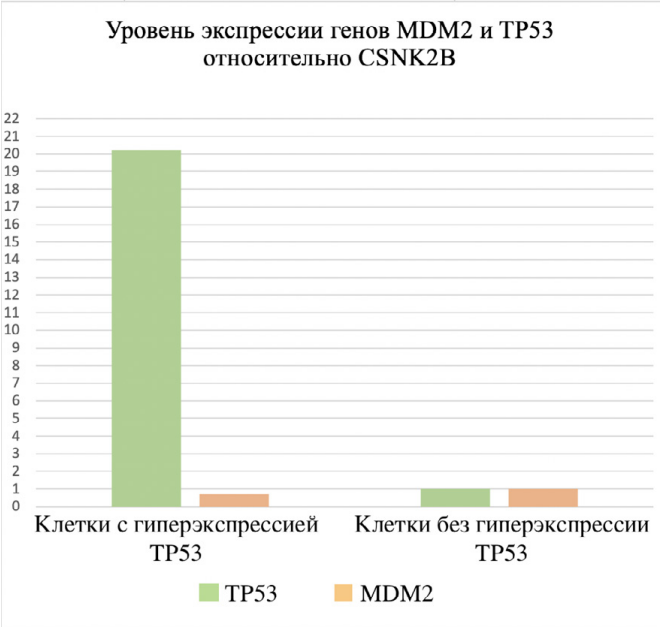


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии генов TP53 и MDM2 в глиомах с вызванной гиперэкспрессией TP53 и без нее на 3-й день после трансдукции

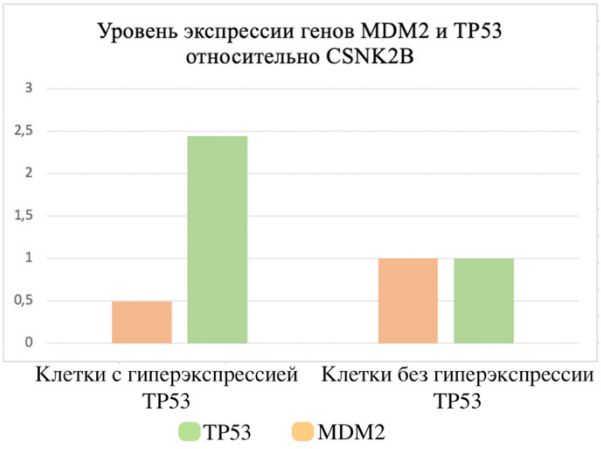


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии генов TP53 и MDM2 в глиомах с вызванной гиперэкспрессией TP53 и без нее на 28-й день после трансдукции

Таким образом, в обоих экспериментах при увеличении экспрессии TP53 снижалась относительная экспрессия MDM2. Снижение пролиферации клеток, говорит о низкой степени регуляции MDM2 и о возможном восстановлении функций p53. Результаты первого эксперимента, проведенного на 3-й день после трансдукции, показывают повышение экспрессии TP53 в 20,2 раза и снижение MDM2 на 30 %. На 28-й день уровень экспрессии MDM2 в 2,44 раза меньше, чем в контрольной линии, а экспрессия TP53 больше в 2 раза. Такие результаты могут быть объяснены разным временем, прошедшим с момента трансдукции: с увеличением количества дней эффективность работы вектора снижается и гиперэкспрессия становится менее явной, однако влияние на MDM2 проявляется в существенном изменении его экспрессии. Во втором случае изменения могли быть не так выражены из-за уже накопленной мРНК MDM2 в клетке. В дальнейшем требуется определить оптимальный день для оценки результатов эксперимента, сравнить влияние гиперэкспрессии TP53 мутантного и дикого типов на уровень экспрессии MDM2, изучить клеточный цикл линий с гиперэкспрессией TP53.

Литература

1. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой // МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2020. илл. 252 с.

2. Vousden K., Lu X. Live or let die: the cell's response to p53 // Nat Rev Cancer. 2002. Vol. 2. P. 594–604. URL: https://doi.org/10.1038/nrc864

3. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network // Nature. 2000. Vol. 408. P. 307–310.

4. Vogan K., Bernstein M., Leclerc J.-M., Brisson L., Brossard J., Brodeur G. M., Pelletier J., Gros P. Absence of p53 Gene Mutations in Primary Neuroblastomas // J. Canc. Res. 1993. Vol. 53. P. 5269–5273. URL: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0027434831&partnerID=40&md5=9bbb19b8fdf90fd97d3532b3fa36292b

5. Cattelani S., Defferrari R., Marsilio S., et al. Impact of a single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene on neuroblastoma development and aggressiveness: Results of a pilot study on 239 patients // Clinical Cancer Research. 2008. Vol. 14 (11). P. 3248–3253. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4725.

6. Pujals A, Favre L, Gaulard P, Wiels J. Activation of wild-type p53 by MDM2 inhibitors: a new strategy for lymphoma treatment // Blood Lymphat Cancer. 2015. Vol. 5. P. 93–100. URL: https://doi.org/10.2147/BLCTT.S60486.

7. Marcus J G W Ladds, Sonia Laín, Small molecule activators of the p53 response // J. of Molecular Cell Biology. 2019. Vol. 11. No 3. P. 245–254. URL: https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz006.

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ УШАСТОЙ МЕДУЗЫ *AURELIA SPP* *

М. Ю. Плотникова[1,3], А. П. Григоренко[1,3], Т. В. Ерофеева[1,3], Ф. Е. Гусев[1,3], Н. А. Дудко[1,3], А. Д. Патрикеев[1,3], П. С. Мостовщикова[2,3], И. А. Косевич[2,3], Е. И. Рогаев[1,2,3]

[1] *Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва*
[2] *Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносов, Москва*
[3] *Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*

E-mail: j.mariia@rambler.ru

Аннотация

Изучение разнообразия и пластичности процессов развития морских беспозвоночных является важным источником знаний в различных аспектах фундаментальных и прикладных биологических наук. Несмотря на то, что дифференцировка и старение многоклеточных организмов необратимы, у некоторых видов живых организмов наблюдается переход к обратному развитию. Такие процессы репрограммирования могут быть связаны с различными факторами стресса: физическим повреждением, неблагоприятными условиями окружающей среды или голоданием. При этом молекулярные механизмы этого процесса остаются неизвестны.

Основной целью проекта является исследование общих молекулярно-генетических механизмов изменения жизненного цикла у медуз *Aurelia spp*., обладающих уникальной способностью к омоложению через обращение жизненного цикла. В задачи данной работы входит: 1) подготовка и проведение глубокого секвенирования транскриптомов разных стадий прямого и обратного развития, получение профилей экспрессии генов разных стадий прямого и обратного развития *Aurelia spp*.; 2) выявление сигнальных путей обратного развития; сравнительный анализ полученных молекулярных данных с результатами исследований на других модельных объектах.

В ходе работы была получена модель прямого и обратного развития *Aurelia spp*. в лабораторных условиях и были охарактеризованы морфологические особенности каждой стадии развития *Aurelia spp*. Была создана коллекция образцов различных стадий прямого и обратного развития *Aurelia spp.* для выделения геномной ДНК и РНК, подготовки геномных и транскриптомных библиотек. В результате работы были выявлены гены и сигнальные пути, экспрессия которых значимо различается на последовательных стадиях прямого и обратного развития медуз Aurelia spp. Обсуждаются механизмы активации генов Wnt, Notch и Hippo-сигнальных путей в развитии Aurelia spp., в сравнении с данными, полученными на других видах Стрекающих.

© М. Ю. Плотникова, А. П. Григоренко, Т. В. Ерофеева, Ф. Е. Гусев, Н. А. Дудко, А. Д. Патрикеев, П. С. Мостовщикова, И. А. Косевич, Е. И. Рогаев, 2021

* Исследование выполнено при поддержке НТУ «Сириус» и РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-5101.

МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ В РЕАЛИЗАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ЗАДАЧ: ОЦЕНКА ПРИЖИВАЕМОСТИ ИМПЛАНТОВ У ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ

А. А. Полякова

ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России

E-mail: aapol13@yandex.ru

Аннотация

По данным ВОЗ большинство пациентов стоматологического профиля пожилого и старческого возраста нуждаются в замещении дефектов зубных рядов с помощью имплантации. Актуальной проблемой является разработка методик по улучшению приживаемости зубных имплантов. Один из важных критериев успеха имплантации является скорость восстановления иннервации и васкуляризации. В связи с этим, актуальной проблемой современной геронтологии и стоматологии является разработка методик по улучшению приживаемости зубных имплантов. Одним из неинвазивных методов для достижения этой цели является метод клеточной биологии на материале буккального эпителия (БЭ).

Разработка оценка роли ферментов синтеза нейромедиатора и маркеров васкуляризации в буккальном эпителии для оценки степени восстановления тканей после имплантации, особенно для людей старших возрастных групп является актуальной научно-практической задачей.

В исследование были включены 2 группы пациентов пожилого возраста (60–74 года) и контрольная группа (25–39 лет). Буккальный эпителий (БЭ) был собран по стандартной методике до и после имплантации, подвергнут иммуноцитохимическому окрашиванию к маркерам васкуляризации — VEGF и его рецепторов, маркерам нейромедиаторов — холинацетилтрансфераза (ХАТ), NO-синтаза. В качестве вторичных антител использовали AlexaFluor 647. Морфометрию проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980 и оценивали относительную площадь экспрессии исследуемого маркера.

Было установлено, что достоверного снижения уровня экспрессии ХАТ в пожилом возрасте до и после имплантации верифицировано не было, что указывает на небольшую прогностическую значимость данного маркера.

Уровень экспрессии VEGF до имплантации в контрольной группе был выше в 1,27 раза по сравнению с показателями после имплантации в контрольной группе. В группе пациентов пожилого возраста этот показатель до имплантации был 11,33 0,57, после имплантации — 9,28 0,48. Уровень экспрессии в контрольной группе до имплантации составил 24,26 0,98, после — 19,11 0,76, в группе пожилого возраста были получены следующие результаты до имплантации 15,46 0,62 и 10,05 0,63 после имплантации. Показатели уровня экспрессии VEGFR2 имели схожую тенденцию. Экспрессия маркера NO у лиц пожилого возраста достоверно повышается по сравнению с этим показателем до имплантации.

Установлено, что уровень экспрессии VEGF, VEGFR 1, VEGFR2 и NO снижается у пожилых людей, что выражается в нарушении васкуляризации и иннервации тканей, задействованных в процессах восстановления после имплантации, а также снижении полярности клеток и скорости передачи сигналов, что влечет за собой значительное снижение числа успешных имплантаций у людей старших возрастных групп.

Возрастные изменение экспрессии пула сигнальных молекул в БЭ у пациентов, после имплантации может явиться основой для разработки нового метода определения эффективности лечения этой патологии и профилактики в зависимости от возраста пациента.

© А. А. Полякова, 2021

ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДАМИ *IN SILICO*

О. Б. Прохоров [1], В. В. Кончук [2], Е. В. Копейкина [3], Т. С. Калинина [2]

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[3] *ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1»*

E-mail: o.prokhorov@g.nsu.ru

Аннотация

В работе показан эффективный алгоритм поиска новых маркеров дифференцирования фолликулярных новообразований щитовидной железы (ЩЖ), основанный на работе в биоинформатических базах данных. За основу была взята модель «микроРНК — ген-мишень». Для ранее полученных экспериментальных данных об уровнях микроРНК, позволяющих различать типы новообразований ЩЖ, были найдены гены-мишени, которые были отсортированы по ассоциации с заболеваниями ЩЖ, тканеспецифичности и упоминаниям в научной литературе. В результате работы, получены 2 группы генов, которые являются перспективными маркерами дифференцирования фолликулярных новообразований ЩЖ.

Рак щитовидной железы (РЩЖ) — это наиболее распространенное эндокринное злокачественное новообразование. Одной из важнейших проблем в лечении РЩЖ является дифференциальная диагностика фолликулярных новообразований на стадии цитологического исследования биопсионного материала. Точность цитологического исследования для фолликулярных новообразований щитовидной железы (фолликулярная аденома (ФА) и фолликулярный рак щитовидной железы (ФРЩЖ)) составляет 56 %. По этой причине часто проводится необоснованное хирургическое вмешательство. На данный момент нет общепринятых маркеров, позволяющих различать фолликулярные новообразования щитовидной железы. В данной работе мы продемонстрировали алгоритм, состоящий из различных методов *in silico*, позволяющий эффективно предсказывать новые маркеры.

Ранее экспериментально был выявлен набор из 19-ти микроРНК, уровни которых значительно отличаются в зависимости от типа новообразования ЩЖ (ФА, ФР, ПР, МР).

Для данных микроРНК был произведен поиск генов-мишеней в базе данных miRTarBase. Для анализируемых микроРНК оказалось 8564 взаимосвязей с 4408 генами-мишенями.

Полученный набор генов анализировался на предмет ассоциаций с наиболее распространенными новообразованиями ЩЖ (ФА, ФР и ПР), в базах данных Malacards, HPO, DisGeNET. Для каждого типа новообразования был получен набор генов, которые ранее с ним ассоциировались, а также являлись генами-мишенями первоначального списка микроРНК. Для ФА — 44, ФР — 71, ПР — 186 генов.

Каждый полученный набор генов, соответствующий определенному типу новообразования, анализировался по тканеспецифичности для ЩЖ с помощью баз данных Bgee и The Human Protein Atlas. Ранее полученные группы, после отбора по тканеспецифичности, имели следующую численность: ФА — 30, ФР — 46, ПР — 123 генов.

Среди генов, ассоциированных с ФА, 13 генов не были связаны с ПРЩЖ и ФРЩЖ по информации из баз данных — *ACTB*, *CDKN2C*, *CD18*, *ERBB2*, *MCM2, RASSF2, SPAG9, SSTR2, 53BP1, INPP4B, CCDC80, GNAS, PLK1*.

Далее в анализ были включены гены, которые экспрессируются в тканях щитовидной железы, но в базах данных нет упоминания об их связи с анализируемыми заболеваниями. Для такого анализа использовался инструмент ToppGene. В качестве тестового набора использовался список 4349 генов-мишеней изучаемых микроРНК, экспрессирующихся в тканях щитовидной железы. Для поиска генов, наиболее тесно связанных с ФА, было проведено следующее: из списка приоритезированных генов для ФА были исключены гены, ассоциированные с ПРЩЖ и ФРЩЖ. Затем были рассмотрены 10 наиболее приоритетных генов для каждого из трех заболеваний ФА, ПРЩЖ и ФРЩЖ. Если ген, входящий в этот список генов для ФА, не был представлен в списках генов для ПРЩЖ и ФРЩЖ, то такой ген можно считать, как наиболее приоритетный для дальнейшего изучения и для разработки средств диагностики аденомы щитовидной железы. Среди таких генов оказались *CDK4, FGFR1, ERBB3, EGR1, MYLK и SRC*.

© О. Б. Прохоров, В. В. Кончук, Е. В. Копейкина, Т. С. Калинина, 2021

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ 5-HT$_7$ РЕЦЕПТОРА В ОБЛАСТИ ЯДЕР ШВА ОКАЗЫВАЕТ АНТИДЕПРЕССИВНЫЙ ЭФФЕКТ И ВЛИЯЕТ НА СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА У МЫШЕЙ *

А. Я. Родный, Т. В. Ильчибаева, Е. А. Куликова, Д. В. Базовкина, В. С. Науменко

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: aleksandr1994rodny@gmail.com

Аннотация

Недавние исследования указывают на важную роль гетеродимеризации рецепторов серотонина 5-HT$_7$ и 5-HT$_{1A}$ в механизмах депрессии и действия антидепрессантов. Ранее мы предположили, что одной из причин депрессии может быть изменение соотношения гомодимеров 5-HT$_{1A}$/5-HT$_{1A}$ и 5-HT$_{1A}$/5-HT$_7$ в пресинаптических нейронах в сторону гомодимеров 5-HT$_{1A}$/5-HT$_{1A}$. В данном исследовании мы подтвердили это предположение и показали, что сверхэкспрессия 5-HT$_7$ рецептора с помощью аденоассоциированного вируса в области ядер шва среднего мозга оказывает значительный антидепрессивный эффект и влияет на функционирование системы 5-HT мозга, как у мышей C57Bl/6J, так и у мышей ASC/Icg, генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению.

Значительная полифункциональность серотонина (5-HT), классического нейромедиатора головного мозга, во многом обусловлена разнообразием его рецепторов. Многочисленные исследования серотониновой системы мозга выявили участие 5-HT рецепторов в регуляции различных типов нормального и патологического поведения и многих физиологических процессов.

Особое внимание научного сообщества в последнее десятилетие привлекают 5-HT$_{1A}$ и 5-HT$_7$ рецепторы, играющие особую роль в ауторегуляции серотониновой системы. Известно, что 5-HT$_{1A}$ и 5-HT$_7$ рецепторы способны образовывать гомо- и гетеродимерные комплексы. Основное скопление 5-HT$_{1A}$ рецепторов расположено в ядрах шва среднего мозга, где они угнетают спайковую активность нейронов и снижают выделение серотонина в синаптическую щель. Было высказано предположение, что одной из причин депрессивных расстройств является сдвиг соотношения между гомодимерами 5-HT$_{1A}$/5-HT$_7$ и 5-HT$_{1A}$/5-HT$_{1A}$ в пресинаптических нейронах в сторону гомодимеров 5-HT$_{1A}$/5-HT$_{1A}$. Исходя из этого, искусственно увеличив количество 5-HT$_7$ рецепторов в пресинаптических окончаниях, можно ожидать восстановление физиологического соотношения гомо-/гетеродимеров, что приведет к антидепрессивному эффекту.

В данной работе мы подтвердили эту идею, показав, что сверхэкспрессия 5-HT$_7$ рецептора с помощью аденоассоциированного вируса в области ядер шва среднего мозга вызывает антидепрессивный эффект в тесте принудительного плавания у мышей C57BL/6J и генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению мышей ASC/Icg (Antidepressant Sensitive Cataleptics). Эти изменения сопровождались повышением уровня мРНК рецептора 5-HT7 в лобной коре головного мозга C57Bl/6J и его снижением в гиппокампе мышей ASC. Важно отметить, что сверхэкспрессия рецептора 5-HT$_7$ приводила к снижению уровня рецептора 5-HT$_{1A}$ во фракции мембранного белка из образцов среднего мозга мышей C57Bl/6J, но не у мышей ASC. Сверхэкспрессия рецептора 5-HT$_7$ вызвала увеличение соотношения 5-HIAA/5-HT в среднем мозге и гиппокампе C57Bl/6J, и во всех исследованных структурах мозга мышей ASC.

Таким образом, сверхэкспрессия рецептора 5-HT$_7$ в области ядер шва влияет на серотониновую систему мозга и вызывает антидепрессивный эффект, как у C57Bl/6J, так и у «депрессивных» мышей ASC. Полученные результаты согласуются с нашим предположением о роли гетеродимеризации 5-HT$_{1A}$/5-HT$_7$ в регуляции депрессивного поведения.

© А. Я. Родный, Т. В. Ильчибаева, Е. А. Куликова, Д. В. Базовкина, В. С. Науменко, 2021

* Работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00025. Животные содержались за счет средств бюджетного проекта № 0259-2021-0015

ПОЛИЭПИТОПНЫЕ ИММУНОГЕНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КОМБИНАЦИИ ИЗВЕСТНЫХ ЭПИТОПОВ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ВИЧ-1 АНТИТЕЛ*

А. П. Рудомётов, Н. Б. Рудомётова, А. А. Ильичев, Л. И. Карпенко

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

E-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Аннотация

Спроектировано три новых полиэпитопных ВИЧ-иммуногена, которые содержат В-клеточные эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами 4E10, 10E8, VRC34.01 и линейный имитатор эпитопа, узнаваемый антителом VRC01. Получены генетические конструкции, кодирующие спроектированные иммуногены и их бактериальные штаммы-продуценты. Показано, что линейные эпитопы в составе иммуногенов распознаются соответствующими моноклональными широконейтрализующими антителами.

Одной из главных проблем при разработке вакцин против высоко изменчивых патогенов, в числе которых ВИЧ-1, их большое генетическое разнообразие, что затрудняет идентификацию антигена, способного обеспечить формирование защитного иммунитета. Некоторые ВИЧ-инфицированные люди естественным образом вырабатывают широконейтрализующие ВИЧ-1 антитела, которые нацелены на более консервативные области вируса и которые активны в отношении большинства штаммов ВИЧ-1. При конструировании иммуногенов нужно так же учитывать, что большинство защитных иммунных ответов против патогенов являются поликлональными, т. е. включают комплекс нейтрализующих антител, нацеленных на несколько различных эпитопов (регионов), что также наблюдается и при использовании комбинаций bnAbs. В последнее время появилось много данных как о новых bnAbs, так и о структуре их эпитопов, но до сих пор остается открытым вопрос, как индуцировать bnAbs с помощью вакцинации.

Цель данной работы заключалась в получении и исследовании иммунохимических свойств полиэпитопных ВИЧ-иммуногенов.

Данные об эпитопах были взяты из базы данных — HIV molecular immunology database. Помимо этого, были использованы имитаторы конформационного эпитопа, узнаваемые антителом VRC01, полученные нами ранее. В качестве линкерных последовательностей, фланкирующих выбранные эпитопы, были использованы охарактеризованные последовательности: EAAAK, EGGE, PG, PGA, GS, GPGPG. Были получены теоретические данные о вторичных структурах и построены модели пространственных структур, рассчитаны физико-химические свойства 16-ти вариантов полиэпитопных конструкций. На основании полученных теоретических данных (растворимость, антигенность, изоэлектрическая точка, стабильность) было выбрано три полиэпитопных конструкции для их дальнейшего изучения. Выбранные спроектированные иммуногены содержат В-клеточные эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами 4E10 и 10E8, которые нацелены на MPER регион, и эпитоп антитела VRC34.01, нацеленного на пептид слияния, линейный имитатор эпитопа, узнаваемый bNabs VRC01, который нацелен на CD4-связывающий сайт, а также В-клеточный эпитоп из V3 петли. Из Th-эпитопов, в состав конструкций входят эпитопы: gp160 (gp120, V2-петля, 167–182 a.o.), gp160 (gp120, 102–117 a.o.), gp160 (gp120, 421–436 a.o.), gp160 (gp41, 827–841 a.o.), gp160 (gp120, 443–459 a.o.) и gag (p24, 288–305 a.o.). Нуклеотидные последовательности данных вариантов были синтезированы и клонированы в составе плазмидного вектора. После этого, были получены бактериальные продуценты рекомбинантных иммуногенов. Установлено, что два иммуногена в клетках-продуцентах находятся в растворимых фракциях, а один — в тельцах включения. Далее, был разработан протокол очистки новых полиэпитопных иммуногенов, и было установлено, что один из вариантов ВИЧ-иммуногенов является растворимым при физиологических условиях. С помощью иммунохимического анализа было показано, что линейные эпитопы в составе иммуногенов распознаются соответствующими моноклональными антителами. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение иммуногенности полученных полиэпитопных конструкций.

© А. П. Рудомётов, Н. Б. Рудомётова, А. А. Ильичев, Л. И. Карпенко, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00879.

DE NOVO СБОРКА И АННОТАЦИЯ ТРАНСКРИПТОМОВ ТРЕХ ВИДОВ ЯЩЕРИЦ *DAREVSKIA*, ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ *D. UNISEXUALIS* И ДВУПОЛЫХ *D. VALENTINI* & *D. RADDEI NAIRENSIS* *

С. С. Ряховский[1,2], С. Д. Очкалова[1,2], А. П. Рысков[1], А. С. Комиссаров[1,2]

[1] *Институт биологии гена РАН, Москва*
[2] *Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

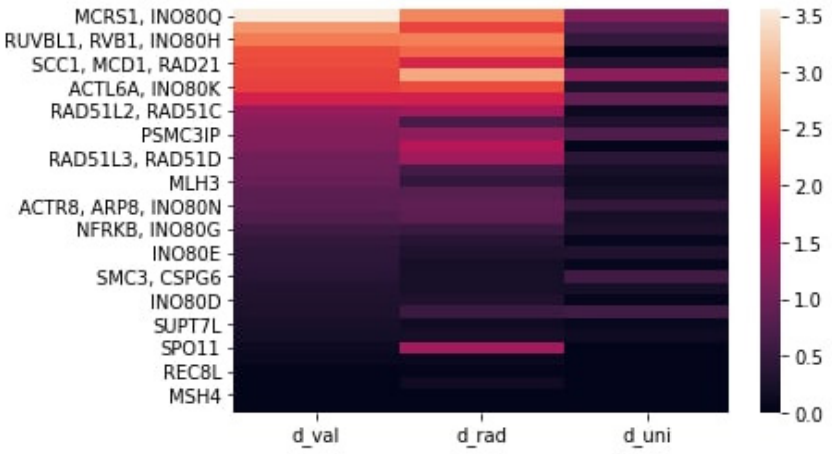
E-mail: ryakhovsky@scamt-itmo.ru

Аннотация

Партеногенез является относительно редким и биологически значимым явлением в процессе полового размножения у млекопитающих. Однополые виды позвоночных, размножающиеся без оплодотворения, встречаются редко и в большинстве известных случаев имеют гибридное происхождение.

Скальные ящерицы относятся к роду *Darevskia*, который включает 29 бисексуальных и семь диплоидных партеногенетических видов. Наличие организмов, размножающихся путем партеногенеза, является отличительной особенностью изучаемого нами комплекса видов *Darevskia*. Благодаря гибридному видообразованию ящерицы *Darevskia* являются ценными модельными организмами для изучения эволюционных механизмов, истоков партеногенеза, генерации генетических вариаций и исследования естественного отбора.

Целью проекта является изучение особенностей транскриптома двух двуполых ящериц *Darevskia raddei nairensis* и *Darevskia valentini* и одного партеногенетического образца *Darevskia unisexualis.* Три транскриптома из тканей яичников были собраны и проанализированы с использованием следующих биоинформатических методов: Trinity, g:Profiler, TransDecoder, Trinotate и разработанных в лаборатории прикладной геномики SCAMT (V2_trim). Мы также написали скрипты на языке Python и пайплайн для автоматизации обработки транскриптомных данных и аннотации эукариот. Анализ показал, что партеногенетические *D. unisexualis* имеют наибольшее количество ридов, контигов, транскриптов и проаннотированных белков. Наибольшее количество аннотированных генов и наиболее аннотированная категория Gene Ontology — клеточные компоненты, менее аннотированными были биологические процессы. В категории молекулярных функций большинство генов относятся к категории молекулярного связывания. Наиболее высоко обогащенные гены в биологических процессах были связаны с регуляцией транскрипции РНК-полимеразы II. Было обнаружено, что в клеточных компонентах наиболее представленными молекулами являются ядро и цитоплазма. Отличительной особенностью партеногенетического *D. unisexualis* является наличие таких путей, как биогенез в эукариотах, репарация несоответствия и репарация эксцизии нуклеотидов. Анализ экспрессии был проведен для генов, связанных непосредственно с регуляцией мейоза. Результаты оценки показали, что в партеногенетическом виде *D. unisexualis* мейотические гены имели пониженную степень выраженности, по сравнению с группой из двуполых ящериц.



Тепловая карта экспрессии мейотических генов в трех видах ящериц

Анализ аннотации трех транскриптомов показал, что партеногенетический вид *D. unisexualis* имеет более полный транскриптом и больше белок-кодирующих генов. Пониженная степень выраженности мейотических генов в *D. unisexualis* может говорить о их возможной роли в изменении нормального течения мейоза и развитии зародыша без участия мужской половой клетки (см. рисунок).

© С. С. Ряховский, С. Д. Очкалова, А. П. Рысков, А. С. Комиссаров, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 19-14-00083 «Геномика и транскриптомика партеногенеза у позвоночных».

ГЕТЕРОГЕННЫЕ 3D-2 КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*

М. М. Савинкова[1,2], М. С. Ермаков[1,2], В. А. Рихтер[1], О. А. Коваль[1,2], А. А. Нуштаева[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: m.savinkova@g.nsu.ru

Аннотация

Клеточные опухолевые сфероиды являются широко используемой 3D моделью *in vitro* в исследованиях злокачественных опухолей молочной железы (ЗОМЖ), которые воспроизводят важные особенности опухолевой ткани, такие как наличие градиента кислорода и питательных веществ, а также субпопуляций покоящихся клеток. Большинство современных опухолевых 3D моделей *in vitro* состоят только из одного типа клеток, но для того, чтобы быть физиологически релевантной, модель должна учитывать сложные клеточные взаимодействия в микроокружении опухоли. Таким образом, целью данной работы было получение гетерогенных 3D-2 моделей ЗОМЖ, состоящих из опухолевых и стромальных клеток, и анализ их функциональных свойств при влиянии экзогенных стимулов. В результате выполнения данной работы получены гетерогенные 3D-2-модели ЗОМЖ и изучено взаимодействие между опухолевыми клетками и клетками стромы в ответ на гормональные и ростовые стимулы.

Онкологические заболевания являются одной из главных причин смертности взрослого населения. 2D и 3D клеточные модели онкологических заболеваний позволяют осуществлять функциональное профилирование опухолей и выявлять молекулярные и клеточные ансамбли, участвующие в патогенезе.

В качестве опухолевых клеток ЗОМЖ использовали иммортализованные линии человека: MCF-7, MDA-MB-231 и SK-BR-3. В качестве стромальных клеток использовали персональные культуры фибробластов: BrC4f и BrC120f, полученные из опухолевых образцов от пациентов с диагнозом ЗОМЖ, и фибробласты, полученные из здоровой ткани — BN120f.

Использование планшетов с низкими адгезивными свойствами Nunclon™ Sphera, в среде DMEM/F12 в присутствии EGF (20 нг/мл), bFGF (20 нг/мл), инсулина (5 мкг/мл), 2 % B27, 0,4 % BSA позволяет получать одиночные опухолевые (3D модели) и опухолево-стромальные сфероиды (3D-2 модели) ЗОМЖ. Использование орбитального шейкера, обеспечивающего диффузию питательных веществ внутрь сфероида, увеличивает длительность культивирования сфероида до 25 суток.

17-b-эстрадиол (E2) играет ключевую роль в прогрессировании, а TGF-β стимулирует рост и метастазирование клеток ЗОМЖ. Жизнеспособность сфероидов оценивали по динамике их роста, выраженного через изменение объема сфероида в процессе культивирования. Гормон E2 в концентрации 1 нМ/мл стимулирует жизнеспособность клеток опухолево-стромальных сфероидов иммортализованных культур вне зависимости от типа фибробластов в составе сфероида. Также E2 оказывает стимулирующее влияние на клетки гормон-независимой линии MDA-MB-231 в 3D модели, что по литературным данным может быть связано с экспрессией сплайс-варианта эстрогенового рецептора ERα36 в клетках, обеспечивающего быстрое связывание гормона с рецептором на мембране.

Для сфероидов, сформированных клетками гормон-зависимой культуры MCF-7, показано, что E2 оказывает влияние на самоорганизацию сфероида при моно- и при со-культивировании, вне зависимости от типа фибробластов, что отражается в увеличении плотности сфероида и сопровождается его самоорганизацией в микроткань.

Фактор роста TGFβ при концентрации 5 нг/мл оказывает стимулирующее влияние на жизнеспособность клеток опухолево-стромальных сфероидов гормон-независимых культур SK-BR-3 и MDA-MB-231, что, возможно, связано с экспрессией в них HER2 или EGFR и реализацией TGFβ/HER2/EGFR сигналинга.

Полученные результаты, в совокупности с литературными данными, позволяют заключить, что 3D-2-модели ЗОМЖ, состоящие из опухолевых и стромальных клеток являются репрезентативной моделью опухоли *in vitro* для исследований взаимодействия между опухолевыми и стромальными клетками.

© М. М. Савинкова, М. С. Ермаков, В. А. Рихтер, О. А. Коваль, А. А. Нуштаева, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 20-74-10039.

ПОЛИМЕРНЫЕ 3D-МАТРИКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УГЛЕРОДНЫЕ ЧАСТИЦЫ, В КАЧЕСТВЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОКРЫТИЯ ДЛЯ СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ

Т. А. Савостьянова[1,2], Ж. К. Назаркина[1], Б. П. Челобанов[1], П. П. Лактионов[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: t.savostyanova@g.nsu.ru

Аннотация

Методом электроспиннинга (ЭС) получено многофункциональное полимерное покрытие для металлических сосудистых стентов, пролонгированно и векторно высвобождающих сиролимус (СРЛ). Для полученного материала исследованы физико-химические свойства и определена антипролиферативная активность в отношении линии фибробластов человека. Проведена оценка способности стентируемого участка артерии к связыванию СРЛ, высвобождающегося из предлагаемого покрытия.

Установка металлических сосудистых стентов (МС) имеет огромное значение в инвазивной кардиологии и позволяет устранять стенозирующие поражения различной морфологии. Главным недостатком такой терапии является высокая частота развития повторных стенозов сосудов в результате пролиферации миофибробластов в ответ на травмирование стенки артерии при имплантации стента.

В целях оптимизации дизайна МС были разработаны стенты с покрытием, содержащим препараты с антипролиферативным и иммунносупрессивным действием, основными из которых стали сиролимус и его производные. Такие стенты снизили частоту рестенозов в первый год после стентирования, однако, в отдаленной перспективе не показали преимуществ, поскольку проблемы травмирования артерии и неравномерность нагрузки каркаса стента на стенку сосуда остались нерешенными. Так как большая часть СРЛ элюирует в кровоток, для поддержания его эффективной концентрации в стенке артерии, на каркас стента принято напылять высокие дозы СРЛ, что ассоциируется с развитием аневризм на соседних участках сосуда, замедлением эндотелизации поверхности МС и повышением риска тромбозов. Очевидна необходимость создания безопасных и высокоэффективных платформ для тканевой инженерии и доставки биоактивных агентов [1].

Ранее в нашей лаборатории была предложена технология нанесения на металлический стент сплошного полимерного покрытия (ПП) методом ЭС. Было показано, что при раскрытии МС со сплошным полимерным покрытием нагрузка от каркаса равномерно распределяется по ПП [2].

В представленной работе методом ЭС были получены 3D-матриксы на основе поликапролактона (ПКЛ), содержащие СРЛ. Показано, что стенка артерии эффективно поглощает и удерживает СРЛ, высвобождающийся из 3D-матрикса, нанесенного методом ЭС на стент. Через 24 ч из стенки артерии в плазму крови диффундирует не более 8 % СРЛ, что на порядок меньше, чем высвобождает 3D-матрикс вне стенки.

Для уменьшения элюции СРЛ из покрытия стента в кровоток предложено использовать многофункциональные ПП. Для этого методом ЭС получен 3-слойный матрикс на основе 5 % ПКЛ, внешний слой которого содержит СРЛ, промежуточный — нагружен частицами активированного угля, внутренний — экспонирует молекулы человеческого сывороточного альбумина. Полученный материал обладает подходящей морфологией поверхности и гидрофильностью (для снижения тромбогенности), высокой пористостью (для обеспечения диффузии СРЛ), достаточной прочностью и эластичностью (для сохранения формы на раскрытом МС). Углеродные частицы (УЧ), введенные в состав матрикса, эффективно связывают СРЛ, высвобождая через 24 ч в плазму крови не более 7 % введенного препарата. Включение в состав покрытия слоя с УЧ способствует векторизации доставки, обеспечивая разницу в концентрации СРЛ от 2 до 5 раз по разные стороны от ПП и уменьшение скорости пролиферации фибробластов, по сравнению с матриксом, не содержащим адсорбирующего слоя.

Предложенный материал может быть использован для пролонгированной векторной доставки препаратов; в частности, он будет перспективен для минимизации побочных эффектов, обусловленных высокими дозами препаратов в покрытиях МС.

Литература

1. Domb et al. (2014). doi:10.1007/978-1-4614-9434-8
2. Kuznetsov et al. (2020). doi:10.3390/polym12081741

© Т. А. Савостьянова, Ж. К. Назаркина, Б. П. Челобанов, П. П. Лактионов, 2021

ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ*

А. В. Сай[1], А. Д. Мацвай[1], И. М. Михайлов[1], Д. А. Киселев[1], А. А. Айгинин[1], М. А. Гордукова[2], Е. В. Галеева[2], Г. А. Шипулин[1]

[1] *ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва*
[2] *Детская городская клиническая больница № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ, Москва*

E-mail: ASay@cspmz.ru

Аннотация

Классические методы молекулярной диагностики возбудителей инфекций не всегда позволяют выявить этиологический агент, что негативно влияет на качество диагностики, которая позволяет осуществлять эффективную терапию и минимизировать тяжелые последствия перенесенной нейроинфекции в детском возрасте. Современным и перспективным подходом молекулярной диагностики возбудителей бактериальных инфекций является применение технологий NGS.

Диагностические системы, основанные на NGS с применением методик метабаркодирования ДНК, позволяют обнаружить широкий спектр бактериальных патогенов в рамках одного исследования. Применяемый нами подход основывается на целевом обогащении локуса V1–V3 гена 16S рибосомальной РНК, который при секвенировании обеспечивает таксономическую идентификацию бактериального возбудителя инфекции.

Нами было проведено ретроспективное исследование коллекции ликворов педиатрических пациентов с клиническими проявления инфекционного поражения ЦНС. Этиология заболевания не была установлена как ПЦР-скринингом на типичные возбудители нейроинфекции, так и с помощью традиционного микробиологического исследования. Амплификация целевых локусов и пробоподготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования была осуществлена по отработанной нами методике. Прототип диагностической системы был валидирован на положительных контрольных образцах — ДНК бактерий *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii.* Чувствительность разрабатываемой системы, при которой сохраняется таксономическая идентификация до вида, составила 10^2 г.е. в реакцию. Высокопроизводительное секвенирование было осуществлено на приборе MiSeq (Illumina). Полученные прочтения картировались на референсную базу данных 16S — SILVA. Обработка осуществлялась алгоритмами Kraken2, BLAST. Для исключения ложноположительных результатов был проведен вторичный анализ в полуавтоматическом режиме.

В исследуемой выборке в 40 % образцов нами была обнаружена ДНК бактерий, способных вызывать нейроинфекции. В 13 % образцов в мы обнаружили ДНК бактерий, которые могут быть возбудителями нейроинфекций: *Haemophilus influenzae, Escherichia sp., Micrococcus luteus, Prevotella melaninogenica* — были обнаружены у пациентов с предварительным диагнозом менингит; у пациентов с судорожным синдромом были обнаружены, в основном, возбудители нозокомиальных инфекций *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и у двух пациентов — *Micrococcus luteus*; в единичных случаях нами были обнаружены бактерии видов *Peptoniphilus grossensis, Burkholderia multivorans, Staphylococcus arlettae, Brevundimonas diminuta, Staphylococcus aureus* у пациентов с сопутствующими инфекционными процессами. В 27 % образцов была обнаружена бактериальная ДНК, отнесенная к редким патогенам человека, либо ранее не описанным в качестве возбудителей инфекционных заболеваний и не относящихся к типичным загрязнителям воды и реагентов; данные результаты неоднозначны и нуждаются в дальнейших исследованиях. Для этих образцов планируется проведение полногеномного секвенирования.

Применяемая нами методика позволяет не только выявлять известных возбудителей нейроинфекций, но и идентифицировать широкий спектр бактериальных патогенов. Использование предложенной нами методики расширяет представление об этиологии заболевания и тем самым дает преимущество по сравнению с традиционными методами, применяемые в клинико-лабораторной диагностике.

© А. В. Сай, А. Д. Мацвай, И. М. Михайлов, Д. А. Киселев, А. А. Айгинин, М. А. Гордукова, Е. В. Галеева, Г. А. Шипулин, 2021

* Работа выполнена в рамках проекта государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (номер государственного учёта в ЕГИСУ НИОКТР АААА-А20-120111090095-5).

2'-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК КАК КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9*

Л. В. Саковина, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: kodi99@list.ru

Аннотация

Широкое применение в молекулярной биологии и генетической инженерии нашел подход с использованием компонентов системы CRISPR/Cas. Перспективной задачей является повышение эффективности и специфичности систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas путем модификации их компонентов. Нами проведен дизайн и сравнительное исследование устойчивости модифицированных направляющих crРНК, tracrРНК и sgРНК к действию нуклеаз, и эффективности работы системы CRISPR/Cas9. Продемонстрировано, что введение модифицированных нуклеотидов увеличивает время жизни направляющих crРНК. Модификация crРНК и tracrРНК не ухудшает эффективность работы системы CRISPR/Cas9, по сравнению с природным аналогом. При этом использование модифицированных sgРНК в системе CRISPR/Cas9 приводит к уменьшению эффективности работы системы.

Действие системы CRISPR второго типа с участием белка Cas9, образующего комплекс с направляющими crРНК и tracrРНК или химерной sgРНК, основана на сайт-направленном расщеплении двухцепочечной ДНК с последующим восстановлением образующегося разрыва в клетке. Актуальной задачей является дизайн и использование химически модифицированных направляющих РНК, обладающих повышенной стабильностью в биологических средах и эффективно направляющих расщепление. Кроме того, введение модификаций в направляющие РНК для системы CRISPR/Cas9 позволяет уменьшить побочные эффекты. Включение модифицированных по 2›-положению рибозы нуклеотидов в состав направляющих РНК представляется перспективным, так как при их введении искажения в структуре дуплекса направляющей РНК с ДНК мишенью минимальны.

Целью работы являлось исследование влияния замены природных нуклеотидов на модифицированные в составе направляющих РНК на их устойчивость к действию нуклеаз и эффективность действия CRISPR/Cas9 системы с их участием.

Созданы модифицированные направляющие crРНК, tracrРНК и sgРНК, содержащие в определенных позициях дезоксирибонуклеотиды, 2'-О-метилрибонуклеотиды, 2'-фторнуклеотиды или LNA-нуклеотиды, а также их 3'-флуоресцеинсодержащие конъюгаты. В результате сравнительного исследования устойчивости модифицированных направляющих crРНК и немодифицированной crРНК к действию нуклеаз сыворотки показано, что введение модификаций повышает время жизни crРНК в присутствии нуклеаз. Продемонстрировано, что введение модифицированных нуклеотидов в состав направляющих crРНК и tracrРНК в положения, не участвующие во взаимодействии с Cas9 белком, не ухудшает эффективность расщепления плазмидной ДНК системой CRISPR/Cas9 в модельной системе *in vitro*. При введении в систему CRISPR/Cas9 модифицированных направляющих sgРНК эффективность расщепления субстрата снижается. Наибольшие константы скорости были зарегистрированы для систем с 2'-фтормодифицированными направляющими РНК.

Таким образом, нами продемонстрирована возможность использования 2›-модифицированных направляющих РНК в составе системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.

© Л. В. Саковина, И. П. Вохтанцев, Д. С. Новопашина, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00838 и проекта базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук 0245-2021-0007.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БЕЛКА СЛИЯНИЯ ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ БЫКА И ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ *SULFOLOBUS SOLFATARICUS*

А. Б. Саченко, Я. В. Диченко, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

E-mail: antosuk@yandex.ru

Аннотация

Методом молекулярной динамики исследовано влияние на стабильность и взаимное расположение центров связывания оцДНК и дцДНК в белках слияния ДНК-экзотрансферазы быка (TdT) и ДНК-связывающих белков SSO и SSO7d архей вида *Sulfolobus solfataricus.*

Цель исследования — создание моделей белков слияния TdT *быка*, белков SSO, SSO7d и анализ их стабильности методом молекулярной динамики (МД) для выявления лучших кандидатов для дальнейшего синтеза фермента с улучшенными характеристиками.

Материалы и методы

Модели белков слияния построены методом гомологичного моделирования с использованием пространственных структур TdT мыши, SSO и SSO7d, представленных в базе данных PDB (идентификаторы в базе данных: 4I27, 2COE, 1C8C и 1O7I). Проведен анализ 8-и последовательностей:

Fl-TdT-SSO — (полноразмерный *фермент с* SSO *на С-конце*);

Tr-TdT-SSO — *транкированный фермент (с удалением первых 161* N-концевых аминокислотных остатков) с SSO *на С-конце;*

SSO-fl-TdT — *нативный фермент с* SSO *на* N-конце;

SSO-tr-TdT — *транкированный фермент с* SSO *на* N-конце;

Fl-TdT-SSO7d — *нативный фермент с* SSO7d *на С-конце*;

Tr-TdT-SSO7d — *транкированный фермент с* SSO7d *на* С-конце;

SSO7d-fl-TdT — *нативный фермент с* SSO7d *на* N-конце;

SSO7d-tr-TdT — *транкированный фермент с* SSO7d *на* N-конце.

Валидацию полученных моделей проводили по карте распределения двугранных углов и показателю QMEAN (SWISS-Model Structure Assessment). Дальнейшую валидацию моделей проводили методом МД в программе AMBER16 в силовом поле Amber (набор параметров ff14). Стабильность моделей определяли по радиусу гирации и изменению среднеквадратичной флуктуации атомов.

Основные результаты

SSO в Fl-TdT-SSO, находится сбоку от N-конца из-за чего ДНК проходящая через активный центр (АЦ) SSO не попадает в фермент (рис. 1). В Tr-TdT-SSO, SSO находится близко к АЦ фермента, и при дополнительной координации субстратом может происходить свободный переход ДНК между АЦ белков.

Слияние белков в SSO-fl-TdT приводит к смещению N-конца фермента и его положение частично занимает SSO, из-за чего ДНК проходит между SSO и N-концом. В транкированной модели SSO-tr-TdT, SSO кроме локализации на месте N-домена, может занимать различные положения, что

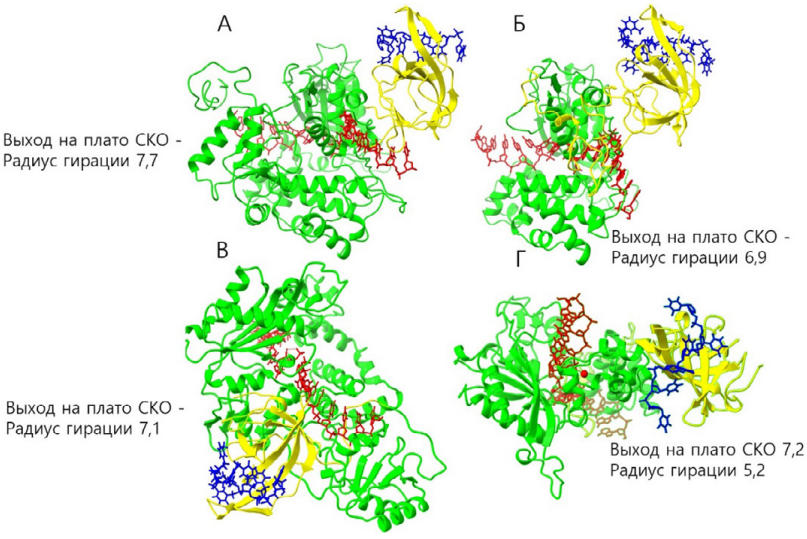


Рис. 1. Модели белка слияния Fl-TdT-SSO (А, TdT зеленым цветом), Tr-TdT-SSO (Б), SSO-fl-TdT *(В) и* SSO-tr-TdT *(Г),* красным цветом выделена оцДНК в АЦ TdT, синим дцДНК в АЦ SSO

© А. Б. Саченко, Я. В. Диченко, А. В. Янцевич, 2021

может способствовать увеличению активности или приводить к ее снижению, при этом SSO с большей вероятностью находится возле АЦ фермента. Установлено, что большей стабильностью обладают SSO-fl-TdT и SSO-tr-TdT.

При присоединении SSO7d к Fl-TdT, ДНК-связывающие домены находятся параллельно друг другу, как в случае присоединения по N- так и по C-концу фермента (рис. 2). В Tr-TdT-SSO7d модели SSO7d занимают положение возле АЦ фермента, что позволяет переходить ДНК с одного аффинного домена на другой, при этом стабильность выше, чем у SSO-tr-TdT. SSO7d в SSO7d-tr-TdT занимает схожее положение, как и в Tr-TdT-SSO7d, но находится дальше от фермента. Необходимо отметить, что транкирование фермента положительно сказывается на его стабильности.

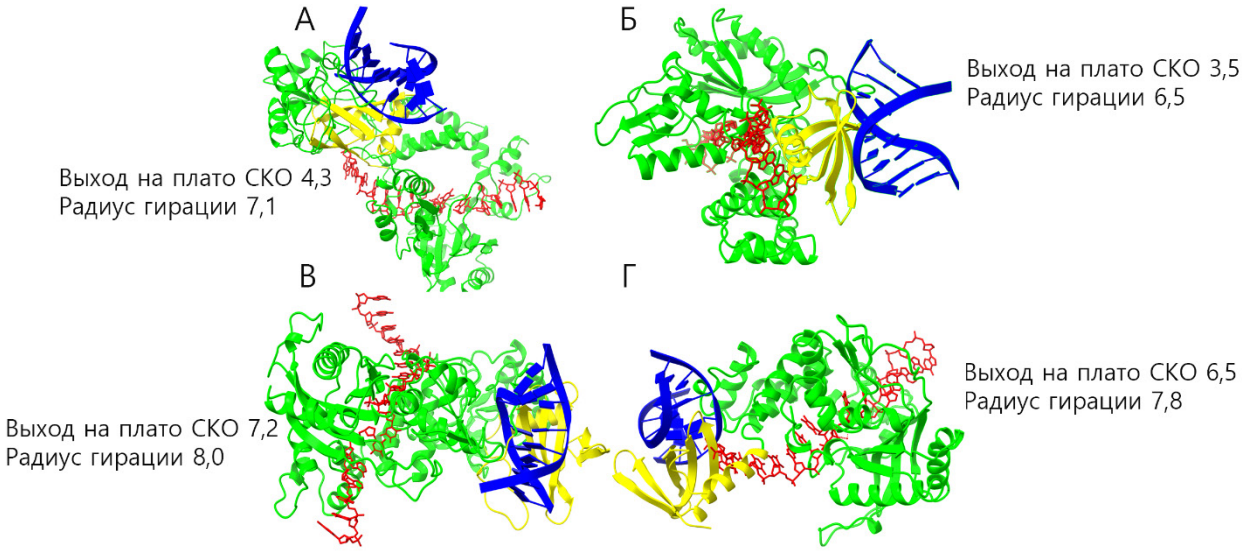


Рис. 2. Модели белка слияния Fl-TdT-SSO7d (А, TdT зеленым цветом), Tr-TdT-SSO7d (Б), SSO7d-fl-TdT (В) и SSO7d-tr-TdT (Г), красным цветом выделена оцДНК в АЦ TdT, синим дцДНК в АЦ SSO7d

Выводы

Для синтеза отобраны модели с высокой стабильностью Fl-TdT-SSO7d, Tr-TdT-SSO7d и с различным расположением ДНК-аффинных доменов, которые способны изменить селективность и активность фермента.

МЕТАБОЛОМНЫЙ ЯМР-АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС НИСАГ (ISIAH)*

А. А. Серяпина, О. Е. Редина, А. Л. Маркель

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

E-mail: seryapina@bionet.nsc.ru

Аннотация

Поиск метаболомных маркеров артериальной гипертонии является одной из актуальных задач развития персонализированной медицины. В данной работе метод ЯМР-спектроскопии позволил выявить несколько потенциальных биомаркеров у гипертензивных крыс линии НИСАГ.

Патогенез артериальной гипертонии затрагивает сразу несколько систем организма, которые находятся в тесном взаимодействии между собой, поэтому при диагностике и выборе терапии особенно важно, как можно точнее определить совокупность механизмов, которые обусловили развитие заболевания. Анализ метаболома, наряду с геномными и транскриптомными исследованиями, позволяет комплексно оценить влияние генотипа и среды на патогенетические процессы. В настоящее время исследователи активно ведут поиск метаболомных маркеров артериальной гипертонии для рационализации и персонализации терапии заболевания.

В данной работе с помощью ЯМР-спектроскопии был изучен метаболический профиль сыворотки крови 3-месячных крыс инбредной линии НИСАГ (ISIAH) с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией, проявление которой ассоциировано с особенностями многих физиологических и поведенческих признаков. В качестве нормотензивного контроля были использованы крысы инбредной линии WAG.

Методом ЯМР-спектроскопии в образцах сыворотки крови были количественно определены концентрации 50 основных метаболитов. Анализ метаболомных данных с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA, post-hoc анализ с применением критерия Фишера) выявил достоверные межлинейные различия концентрации 7 метаболитов в сыворотке крови крыс НИСАГ и WAG. У гипертензивных крыс НИСАГ были снижены концентрации глицина, диметилглицина, саркозина, лизина, серина и треонина. Содержание муравьиной кислоты в сыворотке крови гипертензивных крыс было, напротив, повышено по сравнению с нормотензивными животными.

Полученные данные свидетельствуют о наличии изменений в спектре метаболитов при развитии артериальной гипертонии и указывают на потенциальную возможность выявления метаболомных биомаркеров стресс-чувствительной формы заболевания, что представляет интерес для развития персонализированной медицины. Можно полагать, что выявленные метаболомные маркеры позволят дифференцировать именно стресс-чувствительную форму гипертонической болезни в общем пуле гипертензивных патологий.

© А. А. Серяпина, О. Е. Редина, А. Л. Маркель, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00119.

ЯМР-исследования были выполнены в Международном томографическом центре СО РАН (г. Новосибирск) группой протеомики и метаболомики (рук. Ю.П. Центалович).

РЕГРЕССИЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В ОРГАНИЗМЕ ЭМБРИОНОВ КУР РАЗЛИЧНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ПРОДУКТИВНОСТИ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОЭНЗИМА Q_{10}

А. Ю. Сидорова, Т. О. Азарнова, И. С. Луговая

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

E-mail: pumpkin.and.j@gmail.com

Аннотация

Была проведена обработка инкубационных яиц водорастворимой формой убихинона с целью препятствия прогрессии эндогенной интоксикации продуктами липопероксидации (ПОЛ) у эмбрионов кур различных направлений продуктивности в условиях искусственной инкубации для повышения их жизнеспособности.

Введение

На протяжении всего процесса промышленной инкубации куриный эмбрион испытывает стрессы различного генеза, что нередко приводит к патологии развития или гибели зародыша на одном из этапов онтогенеза [1, 2]. Одним из триггеров стрессорного синдрома выступают цитотоксичные продукты свободно-радикального окисления, прежде всего малоновый диальдегид (МДА) и основания Шиффа (ОШ). Известно, что МДА — продукт свободно-радикального окисления — очень токсичен, как и ОШ, суммарный эффект их действия может выражаться, например, в нарушениях процессов рецепторного взаимодействия, ионного транспорта, мутациях, ингибировании мембраносвязанных ферментов, что опосредовано избыточным синтезом свободных радикалов. В связи с этим возрастает научный интерес к метаболитам, обладающим антиоксидантными свойствами, т. к. их потенциальный эффект может послужить препятствием разрушительному действию вышеуказанных эндогенных токсикантов, обуславливая снижение отходов инкубации, а вместе с тем повышение жизнеспособности. Одним из перспективных антиоксидантов, нашедших широкое применение в медицине, принято считать убихинон, однако исследований эффективности его действия на организм животных в научной литературе представлено мало.

В связи с этим цель исследования — изучить в сравнительном аспекте возможность регрессии эндогенной интоксикации свободно-радикальной природы в организме эмбрионов кур различных направлений продуктивности на фоне применения коэнзима $q_{10.}$

Результаты и обсуждение

Установлено, что исследуемый метаболит при трансовариальном введении способен реализовывать свои антиоксидантные свойства в организме куриных эмбрионов различных направлений продуктивности. Так, в лучшей опытной группе молодняка яичного направления продуктивности, по сравнению с контролем, зафиксировано снижение уровня МДА на 11,3 %, оснований Шиффа на 50 %, при повышении активности СОД на 8 %, тогда как у суточных бройлеров уровень цитотоксичных агентов был снижен равнозначно в 1,5 раза, при повышении активности СОД в 2 раза. При этом показатели вывода цыплят и выводимости яиц в первом случае превосходили контроль на 2,77 и на 3,64 %, во втором на 4, 37 и 4,26 %, соответственно, при тенденции к повышению живой массы, что не могло бы быть возможным в условиях прогрессии деструктивных явлений в клетках, органах, тканях.

Вывод

Антиоксидантный эффект убихинона был выражен в большей степени в эксперименте с бройлерами и вместе с тем оказал большее влияние на эмбриональную жизнеспособность. Заявленное позволяет предположить, что интенсивность ПОЛ (а вместе с тем эндогенной интоксикации) и жизнеспособность взаимосвязаны.

Литература

1. Леткин А. И. Лейкоцитарные индексы крови кур-несушек при неспецифическом стрессорном синдроме // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2020. № 2. С. 102–107.

2. Отрыганьев Г. К. Технология инкубации: Учеб. пособие / Г. К. Отрыганьев, А. Ф. Отрыганьева. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Росагропромиздат, 1989. 189 с.

© А. Ю. Сидорова, Т. О. Азарнова, И. С. Луговая, 2021

ЭКСПРЕССИЯ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ МИТОМИЦИНОМ С*

М. Ю. Синицкий, А. В. Цепокина, Д. К. Шишкова, А. Г. Кутихин, А. В. Понасенко

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово

E-mail: max-sinitsky@rambler.ru

Аннотация

Исследование посвящено изучению экспрессии днк-метилтрансфераз в эндотелиальных клетках, экспонированных митомицином С.

Введение

ДНК-метилтрансферазы (DNMT), катализирующие метилирование нуклеотидных остатков в составе ДНК посредством переноса метильных групп от S-аденозилметионина на цитозин, играют важную роль в развитии млекопитающих. ДНК-метилтрансферазы играют важную роль в поддержании стабильности генетического аппарата, нарушение которой приводит к хромосомным нарушениям, генотоксическому стрессу и канцерогенезу. Показано также, что метилирование промотерных участков генов, катализируемое ДНК-метилтрансферазами, приводит к нарушению процесса транскрипции и играет роль в развитии атеросклероза.

Цель

Оценка экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* в первичных эндотелиальных клетках человека, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия ММС.

Материалы и методы

Исследование выполнено на коммерческих культурах первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной (HITAEC) артерий человека, которые экспонировались в течении 6 часов мутагеном алкилирующего механизма действия ММС в концентрации 500 нг/мл. В качестве контроля выступали клетки HCAEC и HITAEC культивируемые без мутагенной нагрузки. Выделение РНК из клеток осуществляли с помощью набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit по протоколу производителя. Целостность выделенной РНК оценивалась на спектрофотометре Qubit 4 Fluorometer путем измерения RIQ (RNA Integrity and Quality) индекса с помощью набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit. Уровень экспрессии генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* оценивался в эндотелиальных клетках в точках 1 и 2 с помощью количественной ПЦР на амплификаторе ViiA7 («Applied Biosystems», США) с использованием праймеров с флуоресцентным красителем SYBR Green. Результаты ПЦР нормировали на среднее геометрическое значение Ct трех референсных генов *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M*. Экспрессия генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* рассчитывалась по методу ΔC_t. Статистическая обработка результатов исследования была проведена в программе GraphPad Prism 8.

Результаты

Установлено, что в точке 1 (непосредственно после мутагенного воздействия) культуры HCAEC, экспонированные ММС, характеризуются статистически значимым ($p = 0{,}014$) повышением уровня экспрессии гена *DNMT1* по сравнению с контролем. После элиминирования из клеточных культура мутагена (точка 2) в экспонированных ММС культурах HCAEC было установлено достоверное ($p = 0.021$) двукратное увеличение уровня экспрессии гена *DNMT3B*. В клеточных культурах HITAEC не было зафиксировано достоверных изменений экспрессии ни одного из изученных генов ДНК-метилтрансфераз.

Заключение

Таким образом, усиление экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз приводит к гиперметилированию промотерных участков генов, вызывая в эндотелиальных клетках снижение активности репарации повреждений ДНК, вызванных митомицином С, и ассоциировано с формированием эндотелиальной дисфункции в ответ на мутагенную нагрузку в эксперименте *in vitro*.

© М. Ю. Синицкий, А. В. Цепокина, Д. К. Шишкова, А. Г. Кутихин, А. В. Понасенко, 2021

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-7510052.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЯДА ВЕЩЕСТВ ИЗ КЛАССА ПРЕГНАНОВЫХ СТЕРОИДОВ С ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДФ/АТФ-ТРАНСЛОКАЗОЙ

А. С. Смирнов, Д. А. Супонин, Б. В. Шилов, Т. А. Федотчева

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва

E-mail: anton.smirnov.9910@gmail.com

Аннотация

АДФ/АТФ транслоказа — важный фермент, который может выполнять как про-, так и антиапоптотическую функцию. Ингибиторы этого фермента могут использоваться для терапии онкологических, нейродегенеративных заболеваний, снижать кардиотоксичность ряда противоопухолевых препаратов. Исследуемые вещества — потенциальные кандидаты для использования их в терапии ряда онкологических заболеваний. Моделирование производится с целью объяснить полученные экспериментальные данные: может ли токсичность прегнановых стероидов для HeLa и MCF-7 быть связана с этим ферментом.

Материалы и методы

Моделирование производилось методом молекулярного докинга в программе AutoDock v.4.2. Для поиска оптимальных конформаций использовался генетический алгоритм Ламарка со следующими параметрами: ga_run=100, ga_pop_size=400, ga_num_evals=6000000, ga_num_generation=40000. Трехмерные структуры 4 изоформ АДФ/АТФ транслоказы были взяты из базы данных AlphaFold. Докинг производился в следующем пространстве: gridcenter = (-0,04, 0,558, −5,939), npts = (60, 60, 60). Формулы исследуемых веществ были созданы в Marvin Sketch 21.2 и сохранены в mol формате. Общая формула представлена на рис. 1. Геометрия молекул была оптимизирована с помощью силового поля MMFF94. Конвертация молекул проводилась в программе OpenBabel v.2.3.1 в следующем порядке: из mol в pdb, из pdb в pdbqt. В качестве контрольного лиганда был выбран карбоксиатрактилозид. Докинг с такими параметрами был запущен для каждого лиганда 10 раз, затем проводилось усреднение полученных конформаций с минимальной энергией связывания в надежде получить еще меньшую энергию. К сожалению, усреднение не помогло улучшить результаты. Для анализа использовались конформации с минимальной энергией связывания из 10 повторений.

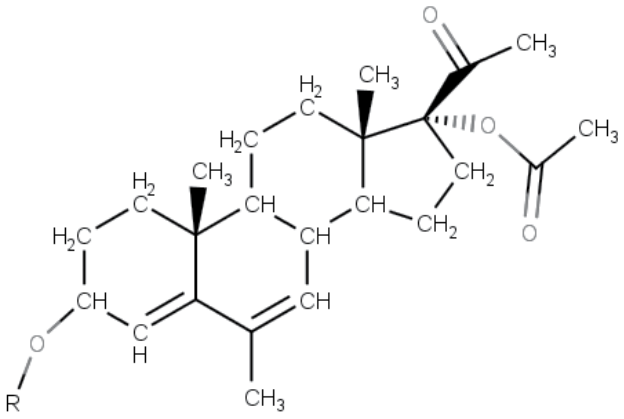


Рис. 1. Общий вид лигандов

Результаты

Графически результаты представлены на рис. 2. Все экспериментальные лиганды связываются с АДФ/АТФ транслоказой менее прочно, чем карбоксиатрактилозид, т. е. энергия связывания больше 11,69 ккал/моль, но меньше, чем 7,8 ккал/моль. Выявлены важные для связывания аминокислотные остатки: R280, K23, R290, N277, R235, R188. Значимой корреляции с экспериментальными данными обнаружить не удалось (тест Спир-

© А. С. Смирнов, Д. А. Супонин, Б. В. Шилов, Т. А. Федотчева, 2021

мена, p-value > 0,1), но визуально заметен тренд: у веществ с бóльшей энергией связывания с мишенью имеют меньшее значение pIC50.

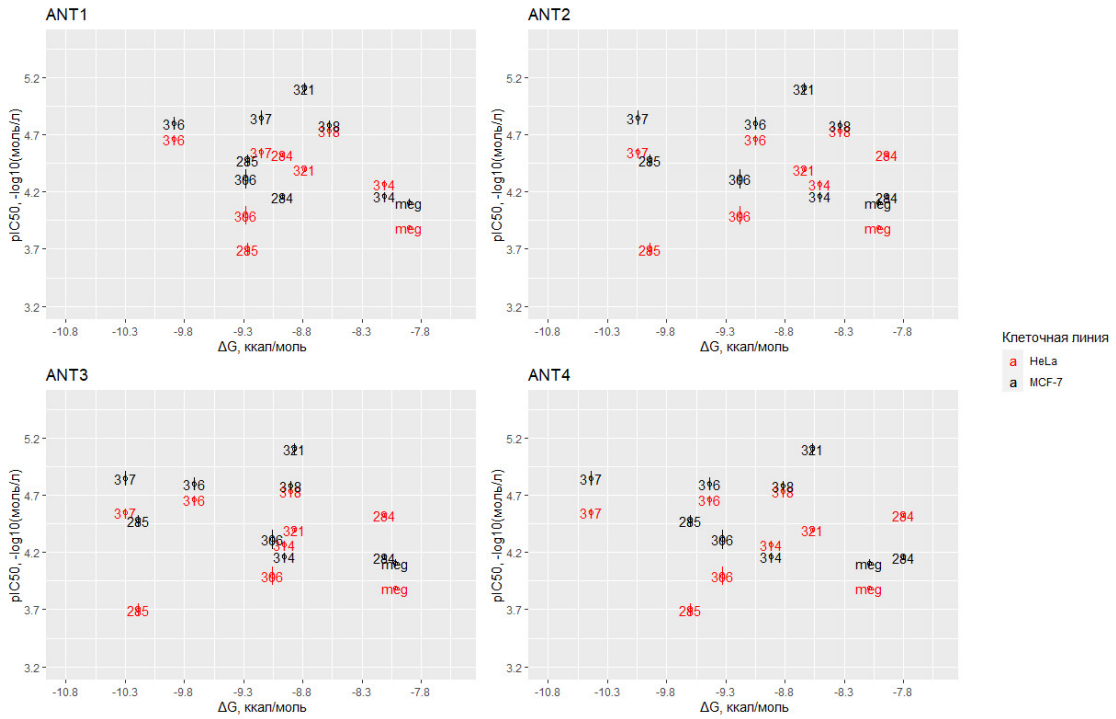


Рис. 2

Выводы

Несмотря на отсутствие значимой корреляции, лиганды сильно связываются с мишенью (расчетные константы диссоциации порядка нМ). По данным EMBL-EBI Expression Atlas в исследуемых клеточных линиях высока экспрессия 1 и 2 изоформы транслоказы, и они играют важную роль в метаболизме и механизмах клеточной гибели. Виден тренд на уменьшение IC50 с уменьшением энергии связывания. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы о связи взаимодействия исследуемых веществ с АДФ/АТФ транслоказой и их токсичностью для HeLa и MCF-7. Наблюдаемые расхождения могут быть связаны с разной температурой модели и опыта; с тем, что некоторые лиганды являются довольно большими. Необходимо подтверждение молекулярной динамикой наличия взаимодействия и его характера.

DEVELOPMENT OF PROTECTIONS FOR ANTISENSE AND BINARY ANTISENSE AGENTS*

V. V. Smirnov[1], D. D. Nedorezova[1], V. S. Drozd[1], A. A. Eldeeb[1], D. M. Kolpashchikov[1,2]

[1] *ITMO University, SCAMT laboratory, Russia*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: v_smirnov@scamt-itmo.ru

Abstract

Antisense oligonucleotides (ASO) are promising agents for cancer gene therapy. The low nucleases resistance of unmodified DNA requires chemical modification, which increase cost, decrease RNase H activity and cause side effects of the oligonucleotide agents. Here, we applied DNA nanotechnology approach to design protector based on modified nucleic acid. The approach will allow increasing resistance to intercellular nucleases for synthetic oligonucleotide agents. Developed protector (i) retains RNase-H dependent activity in antisense agents, (ii) inhibits initiation cleavage of target RNA in the absence of cancer marker.

Most of the ASOs are first-generation ASOs with thiophosphate modification. The chemical modifications increase cellular uptake and endonuclease resistance. But they have low initial RNase H-dependent function (fig. 1).

In this study was suggested using the DNA nanotechnology approach to design a protector based on modified nucleic acid for ASO and biASO (fig. 2).

The reaction was carried out according to the protocol for cleavage with RNase H (NEB #M0297). The cleavage efficiency was calculated by quantifying the intensity of the bands after separation of RNA cleavage products by denatured PAGE as detailed in (fig. 3).

In fig. 3, *A* all protectors inhibit cleavage of GFP-RNA comparison by antisense (ASO), but they initiate cleavage better than antisense with thiophosphate modification (ASO-tio). Using P-GFP-ASO-2'OMe (full size with ribonucleotide in the middle part) show better cleavage by comparison split protectors.

In figure 3, *B* we demonstrate that biASO works the same way as the control ASO. Protected biASO initiated a cleavage better than ASO-tio. Also, GFP-60 cleavage product was observed in the presence of cancer marker. What can be seen is that protected biASO demonstrates a lower cleavage of GFP-60 than biASO.

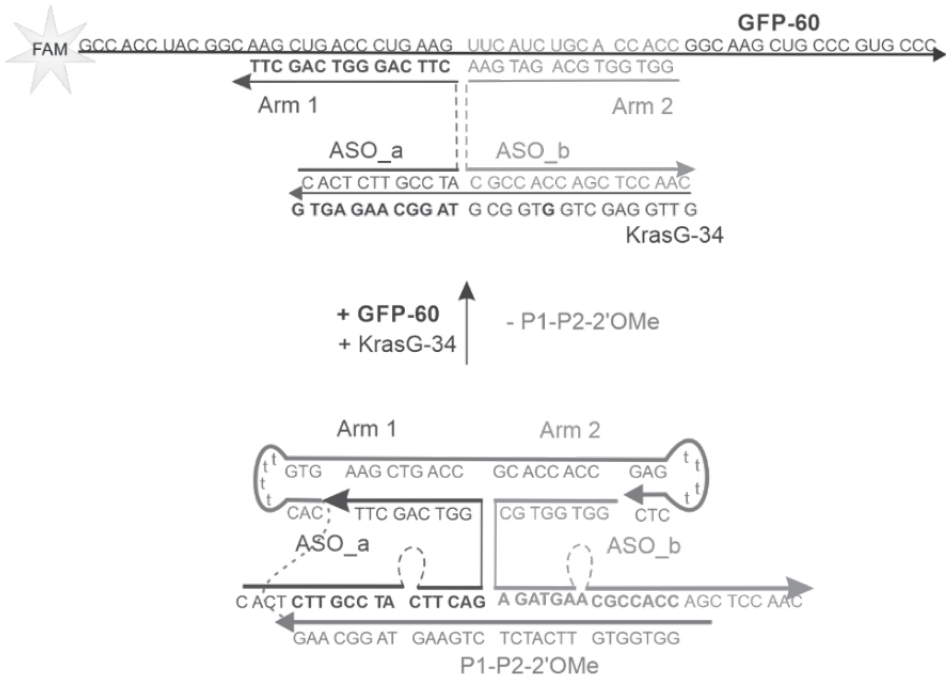
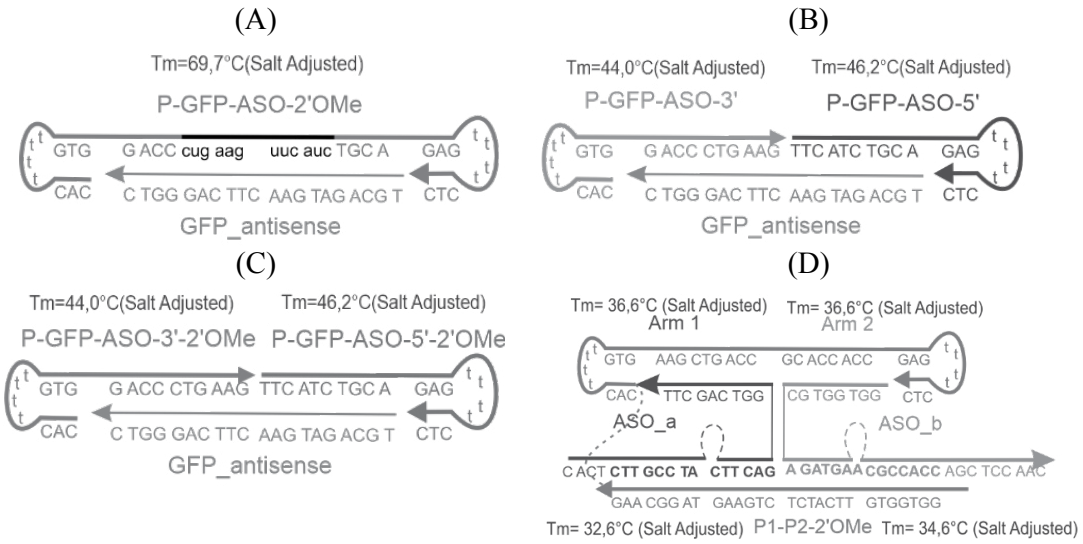


Fig. 1. The mechanism of binding to the cancer marker (KrasG-34) and RNA (GFP-60)

© V. V. Smirnov, D. D. Nedorezova, V. S. Drozd, A. A. Eldeeb, D. M. Kolpashchikov, 2021

* The reported study was funded by RFBR, project № 20-34-90071.

The results of this study demonstrated that We achieved both functions of protector: (i) retaining RNase-H dependent activity in antisense agents, (ii) inhibiting initiation cleavage of target RNA in absence of marker.



N, N – unmodified deoxyribonucleotides, **N** – unmodified ribonucleotides N – nucleotides with 2'OMe modification.

Fig. 2. Schemes of protectors: *A* — full-size modified protector; *B* — split unmodified protector; /*C* — split modified protector; *D* — full-size protector consists of two oligonucleotides

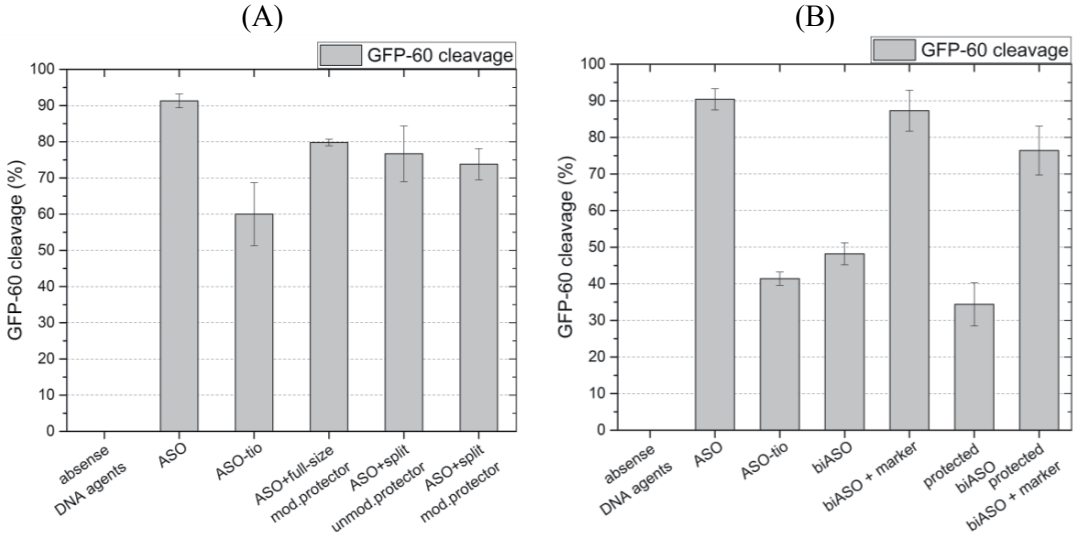


Fig. 3. Percent of GFP-60 cleavage over 20 minutes incubation time: *A* — percent of GFP-60 cleavage by protected ASOs; *B* — percent of GFP-60 cleavage by protected biASO

For the development of this technology, the following studies are required: (i) inhibition RNA cleavage by biASO in the absence of cancer markers; (ii) research functional stability of protected biASO in cells.

DNA construction allows using any target nucleic acids other than the GFP-60, which allows the possibility of damaging arbitrary genes, including housekeeping genes, for effective cancer treatment. The future of this technology depends on its success in suppressing cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ SARS-COV-2 В ОРГАНАХ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *ACE2* ЧЕЛОВЕКА *

Э. В. Соболевская

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

E-mail: darren98@mail.ru

Аннотация

В работе были получены дигетерозиготные мыши генотипов *UbiCre/0_hACE2/0* (вариант 1184) и *RosaCre/0_hACE2/0* (вариант 1186), в геном которых встроены гены Cre-рекомбиназы и *hACE2*. Показано, что активация Creрекомбиназы тамоксифеном приводит к индукции экспрессии трансгена *hACE2* у дигетерозиготных мышей. Показана чувствительность мышей генотипа *Ubi-Cre/0_hACE2/0* (вариант 1184) и генотипа *RosaCre/0_hACE2/0* (вариант 1186) к вирусу SARS-CoV-2 путем анализа значений количества геномэквивалентов вируса в различных органах после заражения.

В настоящее время используются разные подходы к созданию гуманизированных мышей, которые позволили бы изучать клиническую и гистологическую картину после заражения вирусом SARS-CoV-2. Следует отметить, что существующие животные модели не безопасны в плане содержания, разведения и перевозки в период пандемии, т. к. могут являться очагом распространения новой коронавирусной инфекции, поэтому перспективным является создание животной модели, в которой экспрессия гена *ACE2*, а соответственно и чувствительность к вирусу будет индуцируемой.

Культивирование вируса на животных моделях, имеющих отличные последовательности гена *ACE2* от такового у человека, приводит к адаптации и приобретению вирусом мутаций, и, следовательно, к некорректной экстраполяции полученных данных на человека. Поэтому вирусологические работы необходимо проводить на гуманизированных мышах, в геном которых будет встроен трансген *ACE2* человека. Необходимо отметить, что уже существуют животные модели — мыши генотипа *hACE2-KI/NIFDC,* экспрессирующие рецептор ACE2 человека, имеющие постоянную чувствительность к вирусу, и поэтому, являющиеся возможным источником заражения персонала. Кроме того, в случае заражения, у них появятся соответствующие антитела и использование их в качестве моделей будет не корректным.

В связи с этим, возникла необходимость получения мышей, у которых экспрессия рецептора ACE2 человека будет индуцируемой. Таким образом, были получены линии трансгенных мышей, экспрессирующих ген *ACE2* только после индукции тамоксифеном. Поскольку такая модель получена впервые, необходимо было исследовать применимость данных животных для работ с SARS-CoV-2.

В начале исследования было проведено генотипирование потомства с использованием праймеров, соответствующих ожидаемому трансгену. По результатам ПЦР-скрининга были отобраны мыши линии *RosaCre/0_hACE2/0* и *UbiCre/0_hACE2/0* для индуцируемой активации экспрессии гена *hACE2*. На следующем этапе проводили активацию экспрессии гена *Cre*-рекомбиназы с использованием тамоксифена и анализ экспрессии трансгена путем визуализации белка GFP. Затем оценивали наличие экспрессии мРНК гена *hACE2* в легких, мозге, сердце и почках животных. В результате была определена экспрессия мРНК гена *hACE2* во всех органах. Анализ заражения животных вирусом SARS-CoV-2 проводили путем определения количества геномэквивалентов методом ПЦР в реальном времени. Исследование линий *RosaCre/0_hACE2/0* (вариант *1186*) и *UbiCre/0_hACE2/0* (вариант *1184)* выявило высокий уровень вирусного материала в головном мозге и легких животных.

Таким образом, мы показали, что полученная модель с активируемой экспрессией гена *hACE2* является пермиссивной для размножения вируса SARSCoV-2 и дальнейшее исследование патогенеза COVID-19 на данной модели перспективно.

© Э. В. Соболевская, 2021

* Исследования выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА НА ОСНОВЕ REAL-TIME PCR ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САРКОМЫ ЮИНГА

К. В. Субботина

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail: kristina_sybot@mail.ru

Аннотация

Саркома Юинга является одной из самых агрессивных злокачественных опухолей детского возраста, которая чаще всего поражает костную ткань. На данный момент существует определенная сложность проведения дифференциальной диагностики саркомы Юинга с другими опухолями. Поэтому нами была поставлена задача разработать и исследовать молекулярно-генетический метод диагностики саркомы Юинга, основанный на обнаружении химерных транскриптов гена *EWSR1* с помощью Real-Time PCR, который позволит наиболее точно и своевременно выявлять опухоль.

Саркома Юинга (СЮ) представляет собой остеолитическое злокачественное новообразование, которое отличается крайне быстрым распространением метастазов. Механизм развития саркомы Юинга в 85 % случаев обусловлен возникновением патогномоничной транслокации t(11; 22)(q24; q12), в результате которой ген *EWSR1*, расположенный на длинном плече 22-й хромосомы соединяется с геном *FLI1*, расположенным на длинном плече 11-й хромосомы. Реже встречаются альтернативные транслокации, приводящие к слиянию гена *EWSR1* с другими факторами транскрипции ETS. Образовавшаяся перестройка в дальнейшем приводит к экспрессии химерного онкопротеина EWSR1-ETS, который уникально экспрессируется во всех опухолевых клетках и поддерживает их выживание. Поэтому обнаружение одного из нескольких патогномоничных химерных транскриптов, лежащих в основе патогенеза сарком, является золотым стандартом диагностики.

В основном данное изменение генома детектируется с помощью метода FISH гибридизации. Однако, для повышения информативности метода, требуется проведение множественных гибридизаций, поэтому к одному из недостатков метода относится моноплексность, т. е. возможность выявления только одного транскрипта с помощью одной гибридизационной пробы. Поэтому сейчас на первый план выходит метод Real-Time PCR. Преимуществом Real-Time PCR является мультиплексный подход, т. е. возможность выявления одновременно нескольких химерных транскриптов вовремя одного теста. С помощью введения в практику данного метода становится возможной точная и ранняя диагностика саркомы Юинга, а также дифференциальная диагностика между СЮ и другими мелкоклеточными злокачественными опухолями.

Поэтому целью данной работы является разработка метода диагностики саркомы Юинга на основе выявления химерных транскриптов с помощью Real-time PCR, адаптированного для анализа фиксированной ткани в парафиновых блоках (FFPE).

В результате проделанной работы был разработан метод диагностики сарком Юинга на основе выявления химерных транскриптов гена *EWSR1* с помощью Real-time PCR. С помощью этого метода удалось продемонстрировать выявление транскриптов с использованием оригинальных олигонуклеотидных последовательностей и зондов, сконструированных с учетом более специфичного выявления расположения экзонов с максимальным уменьшением длины транскрипта для увеличения эффективности амплификации и чувствительности анализа. Применение такого решения позволит существенно сократить время проведения тестирования с сохранением высокой чувствительности, что является важным преимуществом для анализа нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков. В процессе работы был осуществлен поиск химерных транскриптов гена *EWSR1* в предоставленных 60 образцах СЮ. Самой распространенной хромосомной перестройкой являлась EWSR1/FLI1 (29), а также перестройка EWSR1/ATF1 (16). Химерные траскрипты EWSR1/NRA3 (5), EWSR1/CREB1 (5), EWSR1/ERG1 (5) встречались несколько реже.

Таким образом, полученные нами данные о частоте встречаемости различных типов химерных транскриптов в целом сопоставимы с таковыми, полученными в Европе и Америке.

© К. В. Субботина, 2021

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА ИНТЕГРИНА AVB3 МЕТОДОМ CRISPR/CAS9 SAM-АКТИВАЦИИ

Е. В. Сухинина, А. Г. Першина

Центр биологических исследований и биоинженерии ЦНИЛ СибГМУ
Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий ТПУ

E-mail: suhininaev@mail.ru

Аннотация

αvβ3 интегрин — перспективная мишень для таргетной терапии опухолей. При помощи метода CRISPR/Cas9 SAM-активации получены клеточные линии с повышенной экспрессией αvβ3 рецептора интегрина. Данные линии разработаны с целью исследования наночастиц, направляемых производными RGD-пептида к αvβ3 интегринам в опухолях.

Переносчики, направляемые лигандом αvβ3 интегрина — RGD-последовательностью — предлагаются для доставки в опухоль химиотерапевтических препаратов, нуклеиновых кислот, радионуклидов, пептидов и белков. Стандартный подход к исследованию эффективности адресных препаратов к αvβ3 интегрину основан на использовании клеточных линий с разным уровнем экспрессии данного рецептора. Однако эти клеточные линии различаются и по другим биологическим характеристикам. Применение генетически модифицированных линий с повышенной экспрессией αvβ3 позволит делать более обоснованное заключение об эффективности таргетного препарата, так как в этом случае контрольная (не модифицированная) и опытная клеточные линии будут различаться только по одному параметру.

Целью работы было получить линии клеток карциномы молочной железы мыши 4T1 и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 с повышенной экспрессией интегрина αvβ3.

Для активации экспрессии применяли метод SAM-активации (synergistic activation mediator — медиатор синергичной активации), разработанный в лаборатории Feng Zhang и основанный на использовании системы CRISPR/Cas9. Для интеграции трансгенов, кодирующих компоненты SAM-комплекса, в геном клетки с целью стабильной активации экспрессии целевого гена использовали трансдукцию лентивирусами.

Было сконструировано 11 рекомбинантных плазмид, кодирующих sgRNA к промоторным областям генов ITGAV и ITGB3 *H. sapiens* и itgav, и itgb3 *M. musculus*; наработано 13 типов лентивирусных частиц, содержащих ДНК компонентов SAM-комплекса — dCas-VP64, MS2-p65-HSF1 и 11 различных sgRNA к промоторным областям генов, кодирующих αv и β3 субъединицы интегрина мыши и человека. После трансдукции клеток лентивирусными частицами и отбора устойчивых к соответствующим антибиотикам клонов были получены моноклональные линии модифицированных клеток. Далее методами qRT-PCR и вестерн-блота было подтверждено увеличение экспрессии генов αv и β3 субъединиц интегрина.

Таким образом, нами получены геномномодифицированные линии клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231_27 и карциномы молочной железы мыши 4T1_27 с повышенной экспрессией αVβ3 интегрина.

© Е. В. Сухинина, А. Г. Першина, 2021

GENECUT — ПРОГРАММНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ДИЗАЙНА ОЛИГОНУЛЕОТИДОВ, СБОРКИ И КЛОНИРОВАНИЯ ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Д. И. Сухомлинов[1], И. М. Переверзев[2]

[1]*Новосибирский центр информационных технологий «УНИПРО»*
[2]*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

E-mail: sukhomlinovdmitrii@yandex.ru

Аннотация

Был разработан программный продукт, получивший название GeneCut, содержащий набор алгоритмов, моделирующий разбиение последовательности ДНК на короткие олигонуклеотиды для их последующей сборки методами *Polymerase cycling assembly* или *Thermodynamically balanced inside-out*, либо на длинные блоки для сборки методами *Gibson assembly,* или *Overlap extension polymerase chain reaction*. Последовательность может быть предварительно изменена посредством оптимизации ее кодонного состава, или замены нежелательных сайтов рестрикции и сплайсинга. Помимо этого, были реализованы методы клонирования ДНК *Gibson Assembly* и *Gateway Technology*.

Синтез протяженных нуклеиновых кислот имеет большое значение для современной молекулярной биологии и генной инженерии, поскольку он позволяет искусственно создавать фрагменты с заданной нуклеотидной последовательностью без использования матрицы ДНК. Однако, в настоящее время технологически существует возможность синтезировать только короткие фрагменты ДНК, называемые олигонуклеотидами, впоследствии собираемые в длинную цепь ДНК. Но, при проведении сборки *in vitro*, олигонуклеотиды в смеси могут образовывать не только необходимые целевые, но и многочисленные нецелевые комплексы — шпильки, гомо- и гетеродимеры. Компьютерное моделирование олигонуклеотидных комплексов дает возможность предусмотреть как стабильность целевых, так и отсутствие стабильных нецелевых комплексов и подобрать оптимальный набор входных данных, не осуществляя эксперименты на реальных молекулах.

GeneCut является программой, предназначенной для проведения *in silico* экспериментов по разбиению генов и молекулярному клонированию. Для разбиения на фрагменты требуется задать одну длинную последовательность от одного до четырех шагов эксперимента. Клонирование работает с набором входных последовательностей — векторами и фрагментами — количество которых пользователь задает самостоятельно.

На первом шаге «оптимизация кодонного состава» последовательность изменяется таким образом, чтобы процент встречаемости каждого кодона в ней был как можно ближе к значениям встречаемости кодонов заданного организма.

На втором шаге «исключение сайтов рестрикции и сплайсинга» выбранные сайты заменяются на последовательности той же длины, не содержащие эти сайты. Важным моментом первых двух шагов является сохранение результирующей аминокислотной последовательности.

Третий шаг «разбиение на длинные блоки» необходим при разбиении достаточно длинных (порядка нескольких тысяч символов) последовательностей. Тогда сначала проводят разбиение на длинные блоки, а затем каждый блок разбивают на короткие олигонуклеотиды. Данный шаг моделирует разбиение для последующей сборки методами *Gibson assembly (GA)* или *Overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR)*. Их различие в том, что

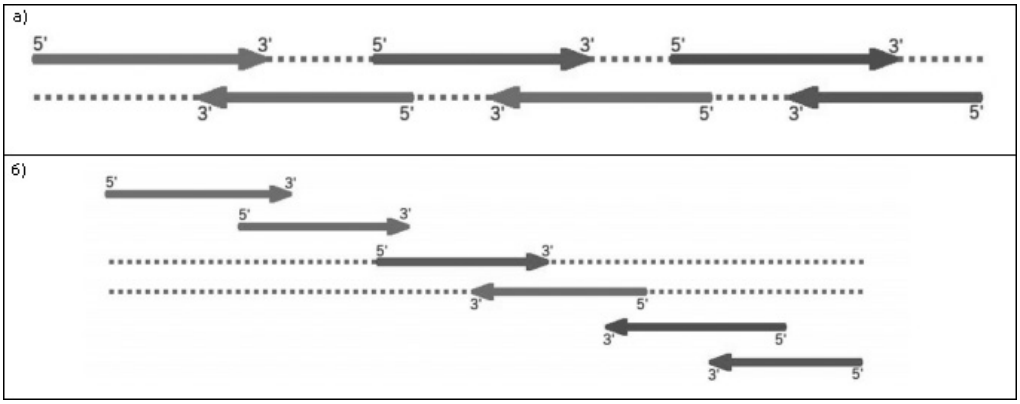


Схема разбиения на олигонуклеотиды методами: *а* — PCA; *б* — TBIO

© Д. И. Сухомлинов, И. М. Переверзев, 2021

разбиение методом *GA* проводится на блоки с концами перекрывания заданной длины, а методом *OE-PCR* — на блоки, имеющие заданные температуры плавления липких концов.

На четвертом шаге «разбиение на олигонуклеотиды» моделируется разбиение входной последовательности на набор коротких олигонуклеотидов для последующей сборки методами *Polymerase cycling assembly (PCA)* или Thermodynamically *balanced inside-out (TBIO)*. Их различие в том, что при разбиении методом *PCA* олигонуклеотиды располагаются по очереди на противоположных цепях ДНК, а при разбиении методом *TBIO* располагаются от центра: на прямой цепи в сторону 5’ конца и на обратно-комплементарной в сторону 3’ конца (см. рисунок).

Вычислительная задача клонирования заключается в подборе соответствующих заданным параметрам температуры праймеров, которые позволят «нарастить» соседние фрагменты (или вектора) и собрать из них единую плазмиду.

ИЗУЧЕНИЕ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РАН МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОБРАБОТКОЙ ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНЫМ ПРОДУКТОМ И ЛИЗАТОМ ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS*

А. А. Тарасенко[1,2], О. Г. Запарина[1], А. В. Ковнер[1], М. Ю. Пахарукова[1,2], В. А. Мордвинов[1]

[1] *Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: a.tapacehko@gmail.com

Аннотация

Работа посвящена исследованию механизмов стимуляции регенерации тканей на модели заживления поверхностных ран мышей линии C57BL/6J при обработке препаратами, полученными из трематоды *Opisthorchis felineus.*

Объект исследования — кошачья двуустка *Opisthorchis felineus*, плоский червь из семейства *Opisthorchiidae*, вызывает описторхоз. При хроническом описторхозе наблюдается увеличение пролиферации клеток эпителия желчных протоков. Трематода выделяет в окружающее пространство экскреторно-секреторный продукт (ЭСП), который является одним из компонентов взаимодействия с хозяином. По-видимому, трематоды *Opisthorchis felineus* содержит белки и ростовые факторы, которые могут усиливать пролиферацию эпителиальных клеток и стимулировать регенерацию тканей.

Цель

Исследование механизмов стимуляции регенерации тканей на модели заживления поверхностных ран мышей линии C57BL/6J при обработке экскреторно-секреторным продуктом и лизатом трематоды *Opisthorchis felineus*.

В рамках проделанной работы был проведен эксперимент по исследованию регенерации ткани млекопитающих под воздействием ЭСП и белков лизата трематоды *Opisthorchis felineus*. Препараты наносили на поверхностную рану мышей размером 15 мм в течение 7–10 дней каждые три–четыре дня в растворе метилцеллюлозы, фиксировали пластырем-спреем для предотвращения растекания.

Анализ зарастания поверхностных ран кожи показал, что ЭСП и белки лизата *O. felineus* способствуют более быстрому зарастанию ран по сравнению с контролем (хлоргексидин и метилцеллюлоза). Площадь воспалительной инфильтрации в ране животных, обработанных препаратами трематоды была незначительно меньше по сравнению с контролем. Однако по клеточному составу в экспериментальных группах (ЭСП, лизат) наблюдали повышенное количество эозинофилов, макрофагов, фибробластов и пониженное количество нейтрофилов по сравнению с контролем (BSA, хлоргексидин, метилцеллюлоза).

Согласно анализу уровня экспрессии маркеров пролиферации клеток, воспаления и организации внеклеточного матрикса с помощью ПЦР в реальном времени, при обработке ран белками лизата трематоды *O. Felineus,* через 10 дней в ране завершаются воспалительные реакции (*Arg1, Ltb4r1, Nos2*), процессы эпителизации (*Krt19*), ангиогенеза (*Vegfa*), организации внеклеточного матрикса (*Mmp2, Mmp9*), поскольку уровень экспрессии мРНК генов в экспериментальной группе (лизат) близок к таковым в здоровой коже. В необработанной ране через 10 дней после ранения активно происходят воспалительные процессы (*Ltb4r1, Nos2*), ангиогенеза (*Vegfa*), организации нового внеклеточного матрикса (*Mmp2, Mmp9*) и слабо активируются процессы эпителизации (*Krt19*) по сравнению со здоровой кожей.

Таким образом, поскольку препараты, полученные на основе трематод *Opisthorchis felineus* способствуют более ускоренному заживлению поверхностных ран, по-видимому, в их составе присутствуют ростовые факторы, которые могут в дальнейшем применяться для стимуляции регенерации тканей млекопитающих.

© А. А. Тарасенко, О. Г. Запарина, А. В. Ковнер, М. Ю. Пахарукова, В. А. Мордвинов, 2021

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МОНОМЕРОВ В СТРУКТУРЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 *IN VITRO* *

П. О. Толстова[1,2], Д. В. Прохорова[1,2], Г. А. Степанов[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

E-mail: po.tolstova@gmail.com

Аннотация

Цель исследования — изучить влияние природных модифицированных нуклеотидов в структуре направляющих РНК на функционирование системы CRISPR/Cas9 *in vitro*. В качестве модификаций выбраны N6-метиладенозин (m6A), 5-метилцитидин (m5C) и псевдоуридин (Ψ). Показано, что включение модифицированных мономеров в направляющие РНК повышает специфичность работы системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

На сегодняшний день разработка новых структур модифицированных направляющих РНК является перспективным направлением для усовершенствования систем геномного редактирования CRISPR/Cas. Использование РНК, содержащих модификации, позволяет снизить уровень иммуностимулирующей и цитотоксической активности при их трансфекции в клетки человека.

В данной работе было исследовано влияние природных модифицированных мономеров: m6A, m5C и Ψ — в структуре единых направляющих (sgРНК) и транс-активирующих РНК (tracrРНК) на эффективность и специфичность функционирования системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

В ходе работы была показана принципиальная возможность полного и частичного включения модифицированных мономеров в структуру направляющих РНК при сохранении целевой активности системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 *in vitro*. Были получены серии sgРНК и tracrРНК с разной глубиной модификации и проведена оценка эффективности направленного гидролиза модельных ДНК-субстратов комплексами белка Cas9 с модифицированными направляющими РНК в зависимости от времени инкубации. Было установлено, что полное замещение аденозина на m6A в структуре tracrРНК наиболее сильно замедляет протекание реакции. В то же время при полном замещении уридина на Ψ и цитидина на m5C эффективность гидролиза ДНК-субстрата по сравнению с немодифицированной РНК существенно не изменяется. Влияние модифицированных мономеров в структуре sgРНК на активность системы CRISPR/Cas9 зависит от их положения внутри протоспейсера. При оценке эффективности гидролиза библиотеки ДНК-субстратов, содержащих мутации в области протоспейсера, было показано, что использование sgРНК, содержащих m6A, m5C и Ψ позволяет увеличивать специфичность системы CRISPR/Cas9 *in vitro*.

Таким образом, использование природных модифицированных нуклеотидов в структуре направляющих РНК позволяет модулировать активность и повышать специфичность работы системы CRISPR/Cas9.

© П. О. Толстова, Д. В. Прохорова, Г. А. Степанов, 2021

* Исследования выполнены в рамках Госзадания ИХБФМ СО РАН (0245-2019-0001).

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ КАМФОРЫ И ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ *ENV*-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1 *

А. А. Фандо [1,2], Н. Б. Рудометова [1], Н. С. Щербакова [1], Д. Н. Щербаков [1], А. С. Соколова [3], О. И. Яровая [3], Н. Ф. Салахутдинов [3], Л. И. Карпенко [1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Новосибирский государственный университет*
[3] *Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

E-mail: nastyafando@gmail.com

Аннотация

Данная работа была направлена на исследование антивирусной активности производных камфоры и глицирризиновой кислоты в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1. В результате проделанной работы было показано, что среди представленных образцов производные камфоры не проявили ингибирующей активности, а производное глицирризиновой кислоты, напротив, проявило активное противовирусное действие в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

Одним из перспективных направлений создания новых антиретровирусных препаратов является разработка ингибиторов проникновения ВИЧ-1, механизм действия которых обусловлен блокированием процесса проникновения вируса в клетку-мишень. Для поиска и оценки эффективности таких препаратов может быть использована технология *env*-псевдовирусов ВИЧ-1, которая позволяет исследовать механизмы проникновения вируса и ингибирование данного этапа в жизненном цикле ВИЧ-1. Перспективными природными агентами, обладающими противовирусными свойствами, являются терпеноиды и их производные. Ранее было установлено, производные терпеноидов блокируют процессы проникновения вируса гриппа, а также обладают высокой активностью против филовирусов, поэтому представляется интересным исследовать активность данной группы соединений в отношении ВИЧ-1.

Цель работы — исследование антивирусной активности соединений, полученных на основе терпеноидов в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

В данной работе была использована панель *env*-псевдовирусов ВИЧ-1, относящихся к подтипу В и к рекомбинантной форме CRF63_02A. В отношении этой панели была исследована ингибирующая активность 10 соединений — производных камфоры и глицирризиновой кислоты, синтезированных в лаборатории физиологически активных соединений НИОХ СО РАН. На первом этапе для тестируемых соединений была исследована цитотоксичность в отношении клеточной линии TZM-bl. Показано, что для производных камфоры диапазон значений CC50 составил от 12,5 до 500 мкМ, а для производных глицирризиновой кислоты от 950 до 1000 мкМ. На втором этапе было проведено исследование противовирусной активности соединений с использованием *env*-псевдовирусов. В результате было показано, что среди представленных образцов производные камфоры не показали активности в отношении псевдовирусов ВИЧ-1, а соединение являющееся производным глицирризиновой кислоты напротив, проявило активное противовирусное действие на *env*-псевдовирусах ВИЧ-1.

© А. А. Фандо, Н. Б. Рудометова, Н. С. Щербакова, Д. Н. Щербаков, А. С. Соколова, О. И. Яровая, Н. Ф. Салахутдинов, Л. И. Карпенко, 2021

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

РОЛЬ IS-ТРАНСПОЗОНОВ В ЭВОЛЮЦИИ CRISPR-CAS-СИСТЕМ*

Я. В. Фёдорова[1,2], А. О. Кошкин

[1] *Институт биологии гена РАН, Москва*
[2] *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*

E-mail: femtokot@gmail.com

Аннотация

Мы исследовали, как часто происходит интеграция IS-транспозонов в CRISPR-Cas системы; какой эффект это несет на функционирование защитной системы; влияет ли на дальнейшее распространение IS элемента по геному; требует ли наличия дополнительных анти-CRISPR генов в составе IS.

Геномы прокариот несут множество вставок генетических мобильных элементов, транспозонов. Самые распространенные из них — это IS-транспозоны (**I**nsertion **S**equences), — короткие последовательности, кодирующие гены транспозаз и минимальный набор генов-помощников, регулирующих работу транспозона. Для борьбы с такими чужеродными ДНК прокариоты обзавелись целым арсеналом защитных систем, одни из которых — CRISPR-Cas системы — белковые комплексы, узнающие чужеродные нуклеиновые кислоты с помощью направляющих РНК. Эволюция защитных систем этого типа происходила через интенсивное заимствование генов из их «жертв» — транспозонов. Так, Cas1 гены часто находятся в геномах в виде solo-Cas1 — одиночных генов, не связанных с другими Cas генами. Показано, что ряд solo-Cas1 — транспозазы, интегрирующие соответствующие транспозоны (каспазоны) в геномы прокариот. Cas-эффекторы также взяли свое начало в составе транспозонов: Cas12a и Cas9 родственны белкам TnpB и iscB, кодируемым IS. Более того, защитные системы все чаще рассматривают как набор ферментов, скомплектованный из белкового арсенала мобильных элементов, эволюционировавших в конкуренции друг с другом и борьбе за репликативные ресурсы клеток-хозяев.

Как именно происходит процесс заимствования генов транспозонов защитными системами? Кажется, что для этого важна пространственная близость в составе ДНК: интегрированный в геном транспозон может «забрать» с собой часть прилежащих генов при копировании. И напротив, гены транспозонов, интегрированные в геном неподалеку от защитных систем, могут, дав преимущество в защите от мобильных элементов, стать частью «оружейного арсенала» клетки.

Интересно, что защитные системы часто располагаются в геноме совместно, в виде «защитных островков». В чем причина такого расположения? Почему защитные островки разрастаются в ширь, интегрируя в себя новые системы, но не представлены равно распределенными по всему геному системами защиты? Возможно, что причина кроется в том, что основной способ создания островков и их расширения — это интеграция мобильных элементов в уже существующие «горячие точки» — защитных локусов и добавления их генов к имеющемуся «оружейному складу» клетки. Действительно, прямая интеграция транспозона в гены защиты обезвреживала бы их самым простым путем.

Мы решили изучить частоту инкорпорации IS элементов в защитные системы клетки на примере CRISPR-Cas, чтобы понять эволюционную связь этих систем и мобильных элементов. Для этого нами был создан биоинформатический подход, позволяющий искать IS элементы, интегрированные в локус CRISPR-Cas систем. Оказалось, что локусы CRISPR-Cas очень часто прерываются последовательностями транспозонов. Такие вставки могут инактивировать систему, нарушая открытые рамки считывания Cas генов, но часто не нарушают ее функционирования, изменяя лишь спейсерный состав CRISPR кассет.

В ходе работы мы предполагали, что точка интеграции транспозона в защитную систему может быть стартом его распространения по геному в связи с инактивацией защиты. Результаты наших исследований показали обратное: распространение IS элементов не обязательно начинается с интеграции в защитную систему, а часто происходит в произвольном участке генома, не связанном с защитными функциями.

Благодаря разработанному подходу нам удалось найти новые IS транспозоны. Часть найденных транспозонов содержит гены-ингибиторы CRISPR-Cas систем, их биохимическая характеризация может помочь найти новые анти-CRISPR компоненты.

© Я. В. Фёдорова, А. О. Кошкин, 2021

* Работа выполнена на средства гранта Президента РФ МК-3793.2021.1.4.

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ ПРОМОТОРА ГЕНА *PCNA DROSOPHILA MELANOGASTER* МЕТОДОМ TRIP

Ю. А. Фёдорова

Новосибирский государственный университет
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

E-mail: juliaroru@gmail.com

Аннотация

Эффект положения (ЭП) гена — это явление, при котором происходит изменение активности гена при изменении его местоположения в геноме, обусловленное действием множества белков-модификаторов хроматина.

Ранее было показано, что промотор гена *PCNA* дрозофилы, кодирующий консервативный белок, участвующий в процессе репликации, способен избегать ЭП. Предполагается, что в промоторе этого гена присутствуют специфические регуляторные последовательности ДНК, ответственные за это уникальное свойство. Целью данной работы является идентификация таких регуляторных последовательностей.

Известно, что ЭП представляет собой сложный процесс, включающий работу множества генов-модификаторов, ответственных за организацию структуры хроматина и экспрессию генов в том или ином типе хроматина.

В нашем исследовании используется метод TRIP (thousands of reporters integrated in parallel), позволяющий проводить встройку трансгенов в различные места генома, а также выполнять одновременный анализ их транскрипционной активности, что фактически позволяет выполнить множество отдельных исследований в одном эксперименте. Метод TRIP основан на использовании мобильных генетических элементов (в нашем случае — системы транспозона piggyBac), а также технологии штрихкодирования и высокопроизводительного секвенирования ДНК.

Для реализации TRIP-эксперимента были созданы штрихкодированные плазмидные библиотеки с делециями и мутациями разных участков промотора гена *PCNA*. Для равномерной встройки трансгенов по геному, были разработаны химерные транспозазы, слитые с белками, ассоциированными с разными типами гетерохроматина. TRIP-эксперименты были выполнены на культивируемой клеточной линии клеток Кс167 *дрозофилы*.

Анализ последовательности нуклеотидов промотора гена *PCNA* позволил предположить, что свойство избегания ЭП может быть связано с сайтами связывания транскрипционных факторов Dref, E2f1 и Dl. С целью проверки этой гипотезы нами были оптимизированы условия проведения РНК-интерференции генов, кодирующих эти транскрипционные факторы, в клетках Кс167.

© Ю. А. Фёдорова, 2021

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ЕГО ГИПОПЛАЗИИ*

Н. В. Царева

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь

E-mail: tsarev_vp@mail.ru

Аннотация

Иммуногистохимические (ИГХ) исследования молекулярных маркеров рецептивности эндометрия являются информативными, доступными для практического здравоохранения, современными способами изучения репродуктивной функции. В последнее время с этой целью определяют уровень экспрессии и соотношение таких молекулярных регуляторов рецептивности, как рецепторы к эстрогенам и прогестерону, лейкемия ингибирующий фактор (ЛИФ), интегрин αvβ3 и ген HOXA10. Однако по настоящее время, при гипоплазии эндометрия (ГЭ) указанные маркеры исследованы недостаточно, а их комплексное изучение не проводилось. Кроме этого, наше внимание привлек недавно представленный поверхностный маркер высококлоногенных эндометриальных мезенхимальных стволовых клеток (ЭМСК) – SUSD2 (суши домен). Предположительно ЭМСК играют важнейшую роль в ежемесячной регенерации функционального слоя эндометрия и формировании его рецептивности.

С целью оценки состояния рецептивности эндометрия у 50 пациенток с маточным бесплодием (МБ) при ГЭ выполнено ИГХ исследование экспрессии эстрагенового рецептора альфа (ЭРα), рецептора для прогестерона (ПР), ЛИФ, интегрина αvβ3, гена HOXA10 и маркера SUSD2 в эндометрии. Из них — 36 пациенток с ГЭ, у которых стандартная терапия по протоколам МБ (гормональная и / или ЭКО) не дала результата, вошли в основную группу, а 14 пациенток, у которых после стандартной терапии наступила беременность — в группу сравнения. Контрольную группу составили 23 соматически здоровые фертильные женщины без заболеваний репродуктивной системы. Забор материала для исследований осуществлялся путем пайпель-аспирационной биопсии на 20–22 день менструального цикла.

В результате исследований установлено, что у пациенток с ГЭ, при сравнении с контрольной группой здоровых женщин, отмечается повышение ИГХ экспрессии ЭРα в железах и гена HOXA10 в железах и строме эндометрия, снижение экспрессии ЛИФ в железах эндометрия и экспрессии поверхностного маркера ЭМСК SUSD2 — как в железах, так и в строме эндометрия. При этом, для локализации ЭМСК в строме эндометрия было характерно периваскулярное расположение. Наличие достоверной отрицательной корреляционной связи средней силы между величиной экспрессии гена HOXA10 и экспрессий поверхностного маркера ЭМСК SUSD2 в эндометрии у пациенток с ГЭ позволяет предполагать компенсаторный механизм существующих взаимосвязанных репродуктивных нарушений при данной форме МБ.

При сравнении ИГХ экспрессии молекулярных маркеров рецептивности в эндометрии пациенток основной группы, с аналогичными данными пациенток группы сравнения, у которых наступила беременность, отмечено относительное снижение экспрессии ЭРα в строме эндометрия, интегрина αvβ3 в железах эндометрия, гена HOXA10 и поверхностного маркера ЭМСК SUSD2 — как в железах, так и в строме эндометрия.

© Н. В. Царева, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА TNFRSF11B У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Ю. В. Чумачева, Д. С. Сташкевич

Челябинский государственный университет

E-mail: julia_konata@mail.ru

Аннотация

Продукция цитокинов про- и противовоспалительного характера и уровень экспрессии их рецепторов определены генетически: совокупностью вариаций аллельных генов, которые кодируют данные цитокины и их рецепторы. В результате чего их полиморфная структура может влиять на исход иммунного ответа организма. Актуальность выбранной темы заключается в том, что генетический полиморфизм гена *TNFRSF11B* может иметь то или иное влияние на исход иммунного ответа организма, тем самым играя роль в восприимчивости к различным заболеваниям, включая ревматоидный артрит. В статье приведены данные по распределению аллельных вариантов гена TNFRSF11B в зависимости от возраста и от пола.

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным поражением внутренних органов [2].

Особый интерес представляет понимание путей, по которым реализуются генетические факторы при ревматоидном артрите. В этом отношении наибольший интерес представляет ген TNFRSF11B, так как экспрессия белка и его функционирование находится под генетическим контролем, одним из механизмов реализации которого является однонуклеотидный генетический полиморфизм.

Согласно литературным данным, биологическая роль однонуклеотидного полиморфизма гена TNFRSF11B в точке 1181G>C заключается в том, что в результате его проявления происходит уменьшение экспрессии остеопротегерина (OPG). Вследствие чего, изменяется баланс процессов резорбции костной ткани, и, как следствие, усиление процессов резорбции костной ткани.

Исследования ассоциации полиморфизма G1181C OPG с РА носят противоречивый характер. H. Yang. [5] обнаружили, что полиморфизм не был связан с предрасположенностью к РА, тогда как C. A. Nava-Valdivia [4] сообщили, что *OPG* полиморфизма гена TNFRS11B повышал риск развития РА. Цель исследования — поиск ассоциации SNP в позиции 1181 G/C гена TNFRSF11B с предрасположенностью, возрастом и полом больных ревматоидным артритом русской популяции Челябинской области.

Выборка больных состояла из 71 человека группы русских Челябинской области с диагнозом ревматоидный артрит. В качестве группы сравнения использовали коллекцию ДНК образцов 80 кадровых доноров стволовой клетки ГБУЗ «ЧОСПК», проживающих в г. Челябинске и Челябинской области, сформированную случайным образом. Генотипирование полиморфного локуса rs2073618 проводили методом аллель-специфической ПЦР (реактивы ООО «НПФ Литех»). Для расчета достоверности различий аллелей и генотипов использовали программу Past, критерий $\chi 2$, OR с расчетом 95 % ДИ; онлайн-приложения медицинская статистика [2].

В ходе оценки распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма гена TNFRSF11B в позиции G1181C зафиксировано увеличение частоты гетерозиготного генотипа 1181*GC в группе сравнения. Было зафиксировано увеличение частоты гетерозиготного генотипа 1181*GC на уровне тенденции в группе женщин сравнения.

В группе больных с поздним возрастом первой атаки РА была повышена частота встречаемости аллеля с заменой 1181*C.

Вероятно, данный полиморфизм ассоциирован с возрастом начала ревматоидного артрита. В данной публикации приводятся результаты пилотного исследования. Для подтверждения данного предположения необходимо продолжить исследование.

Литература

1. Лечение ревматоидного артрита. Клинические рекомендации // Под ред. Е. Л. Насонова. М.: Алмаз, 2006. 118 с.

2. Медицинская статистика [Электронный ресурс] / калькуляторы / авт. Д. Марапов. 2013. Режим доступа: https://medstatistic.ru/calculators/calchi.html. Дата доступа: 25.07.2021.

3. Ревматология: Клинические рекомендации / Под ред. Е. Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.

4. Nava-Valdivia C. A., Saldaña-Cruz A. M., Corona-Sanchez E. G., et al. Polymorphism rs2073618 of the TNFRSF11B (OPG) Gene and Bone Mineral Density in Mexican Women with Rheumatoid Arthritis // J. Immunol Res. 2017;2017:7680434. doi:10.1155/2017/7680434

5. Yang H., Liu W., Zhou X. et al. The association between RANK, RANKL and OPG gene polymorphisms and the risk of rheumatoid arthritis: a case-controlled study and meta-analysis // Biosci Rep. 2019. Vol. 39(6). BSR20182356. Published 2019 Jun 28. doi:10.1042/BSR20182356.

© Ю. В. Чумачева, Д. С. Сташкевич, 2021

СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ПАРАМЕТРИЗАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МОДЕЛЯХ ГЛУБОКОГО ОБУЧЕНИЯ

Е. В. Шабурова, Д. В. Антонец

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

E-mail: sliza.nsk@gmail.com

Аннотация

Быстро растущий объем биологических данных открыл дорогу к использованию разнообразных методов глубокого обучения для решения биоинформатических задач. Для этого зачастую необходимо представить дискретные биологические данные в виде векторов, на которых впоследствии и будет учиться модель. Чем корректнее будет осуществлен этот этап, тем больше релевантной информации будет передано для обучения модели, тем лучше будет решена исходная задача. В данной работе проводится сравнение эффективности различных подходов к параметризации аминокислотных последовательностей для предсказания способности пептидов связываться с молекулами MHC I класса. Были использованы классические подходы: прямое кодирование (one hot encoding), использование матриц сходства аминокислотных остатков, таких как BLOSUM62, AAindex и PMBEC, а также новые — обучаемые — способы параметризации, основанные на рекуррентных нейросетевых моделях (RNN) и на основе языковой модели protBERT, обученной на многообразии известных белковых молекул. Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе обучаемых подходов над детерминистскими, но необходимы дальнейшие исследования для изучения влияния различных гиперпараметров, для обучения скрытых представлений на качество итоговых моделей.

В настоящее время в биоинформатике наблюдается повышенный интерес к методам глубокого обучения в связи с их примечательной эффективностью по сравнению с классическими методами. Особенно это касается задач, работающих непосредственно с информацией из аминокислотных или нуклеотидных последовательностей, ведь с появлением новых технологий секвенирования объем таких данных растет экспоненциально. В связи с особенностью работы нейросетей, исследователям требуется представить последовательность ДНК или белка, как многомерный вектор непрерывных величин, или, иными словами, параметризовать ее.

Существует несколько способов параметризации. Так, самым простым является прямое кодирование (one hot encoding), когда каждый аминокислотный остаток кодируется в виде разреженного вектора, однако такой метод упускает много биологической информации. В связи с этим, исследователи разрабатывают матрицы перевода, в которых включены разного рода априорные знания о свойствах аминокислотных остатков; это может быть информация о физико-химических свойствах (AAindex), о частоте аминокислотных замен в кластерах родственных белков (BLOSUM62), а также о вкладе аминокислот в задачи предсказания связывания пептидов с молекулами MHC I класса (PMBEC). Однако, методы глубокого обучения, используемые в области обработки естественного языка, при достаточно большом объеме данных могут сами обучаться корректной репрезентации последовательностей, будь то слова в естественном языке или аминокислоты в белке. Такие представления обычно называют эмбеддингами. Так, эмбеддинги можно обучать непосредственно в процессе решения определенной биоинформатической задачи, а можно получать отдельно, используя модели, предобученные на большом корпусе биологических данных (например, protBERT).

Целью этой работы является сравнение разных способов параметризации аминокислотных последовательностей. Для этого мы предлагаем для каждого предложенного выше способа обучить нелинейный классификатор с одним скрытым слоем на примере решения задачи о предсказании связывания пептидов с молекулами MHC I класса. Сравнение проводится на основе оценки качества кластеризации репрезентаций связывающихся и не связывающихся пептидов при помощи библиотеки UMAP, а также качества предсказаний классификаторов при помощи метрик AUC, F1 и коэффициента корреляции Мэтьюса.

В результате наблюдали преимущество использования обучаемых эмбеддингов над классическими способами параметризации аминокислотных последовательностей. В связи с этим, перспективным представляется дальнейшее изучение различных параметров обучения эмбеддингов, таких как размерность, требования к датасетам, иные архитектуры нейронных сетей, а также включения дополнительных данных о структуре белковой последовательности.

© Е. В. Шабурова, Д. В. Антонец, 2021

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕКОНВОЛЮЦИЯ *IN SITU* ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИПИДОВ В ПРОЦЕССЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТКАНЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА*

М. А. Шамраева[1], С. В. Силкин[1], В. А. Елиферов[1], К. В. Бочаров[2], С. И. Пеков[3], И. А. Попов[1]

[1] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2] *Обособленное структурное подразделение Институт энергетических проблем химической физики им. В. Л. Тальрозе ФИЦ химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва*
[3] *Сколковский институт науки и технологий, Москва*

E-mail: shamraeva.ma@mipt.ru

Аннотация

Масс-спектрометрическая визуализация (MALDI-MSI) позволяет получать распределение широкого класса биомолекул в образцах мягких тканей с целью исследования метаболических изменений на клеточном уровне. Присутствие ионов щелочных металлов в физиологических концентрациях в тканях приводит к неспецифической катионизации, которая усложняет интерпретацию данных масс-спектрометрической визуализации, а сигналы ионов фосфолипидов, фосфатидилхолинов, фосфатидилсеринов и липидов других классов обнаруживаются для соответствующих протонированным $[M+H]^+$, катионизированным натрием $[M+Na]^+$ и калием $[M+K]^+$ пикам, что не позволяет достоверно дифференцировать аддукты [1]. В данной работе предлагается метод молекулярной деконволюции *in situ*, позволяющий добиться высокой чувствительности и высокого пространственного разрешения.

Для оценки вклада катионизированных ионов липидов в наблюдаемый масс-спектр проведено сравнение спектров и идентификация аддуктов в образцах головного мозга мыши, обработанных растворами 150 мМ AcOK (рис. 1), AcONa, $AcONH_4$, LiTFA и водой, а также образцов без дополнительной обработки.

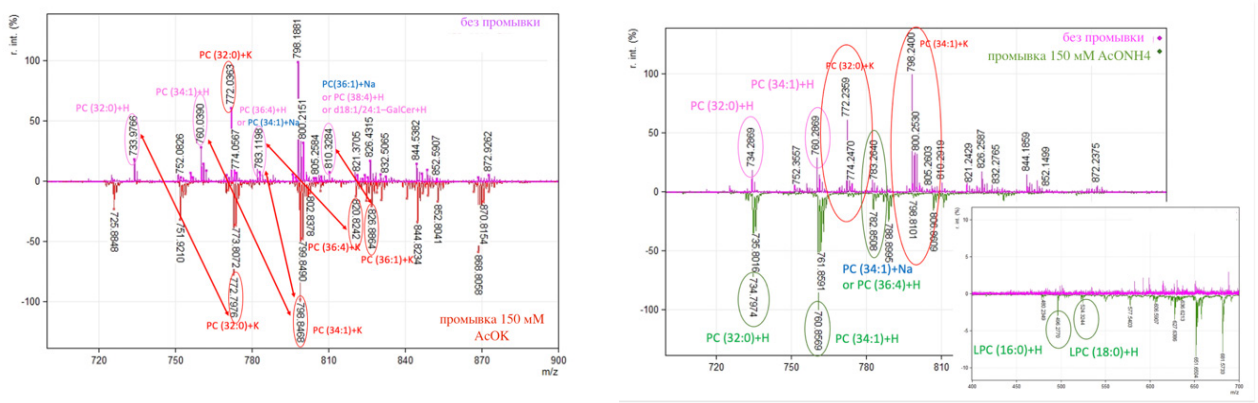


Рис. 1. Сравнение усредненных масс-спектров, полученных из среза мозга мыши, сублимационно покрытого MALDI-матрицей (дигидроксибензойной кислотой) с последующей перекристаллизацией в парах воды без промывания и с промыванием: а) 150 мМ AcOK и б) 150 мМ $AcONH_4$ (m/z 700–900), интенсивность в процентах от максимума

Процесс перекристаллизации матрицы после сублимации был оптимизирован по времени для сокристаллизации матрицы и аналитов (рис. 2).

В существующих исследованиях демонстрируется, что одним из преимуществ обессоливания in situ для профилирования липидов является улучшение соотношения сигнал / шум аналитов [2, 3]. Однако оптимизированный метод обессоливания в комбинации с сублимационным нанесением и перекристаллизацией матрицы приводит к значительному увеличению отношения S/N для липидных аналитов тканей (см. таблицу).

© М. А. Шамраева, С. В. Силкин, В. А. Елиферов, К. В. Бочаров, С. И. Пеков, И. А. Попов, 2021

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-00337-20-02, проект № 0714-2020-0006), с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ХФ им. Н. Н. Семенова РАН.

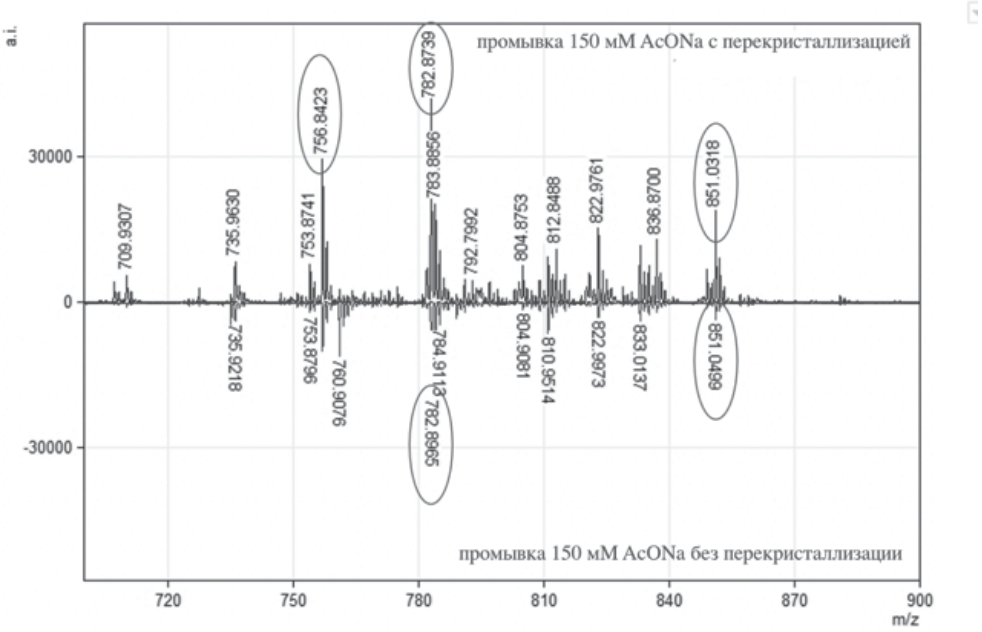


Рис. 2. Сравнение усредненных масс-спектров, полученных из среза мозга мыши, сублимационно покрытого MALDI-матрицей (дигидроксибензойной кислотой) в сочетании с методом перекристаллизации в парах воды и без, после промывания 150 мМ $AcONH_4$ (m/z 700–900)

Отношения S/N для спектров, полученных в результате различных методов нанесения матрицы — без перекристаллизации и с перекристаллизацией после обработки 150 мМ AcONa и AcOK

	PC(32:0)+Na	d18:1/h24:0–GalCer+Na	PC(32:0)+K	PC(34:1)+K	PC(36:6)+K
S/N (без перекристаллизации)	41,4	14,4	110,1	158,0	17,4
S/N (с перекристаллизацией)	43,2	26,6	151,1	193,2	69,7

Таким образом, представленный новый метод пробоподготовки образцов, позволяет как повысить чувствительность метода MALDI-масс-спектрометрической визуализации липидного профиля образцов тканей головного мозга, в том числе эндогенных метаболитов опухолей головного мозга человека, так и дает возможность проводить однозначную идентификацию данных липидного профилирования срезов тканей, оценивая вклад различных катионизированных ионов-аддуктов.

Литература

1. A simple desalting method for direct MALDI mass spectrometry profiling of tissue lipids / Hay-Yan J. Wang, Cheng Bin Liu, Hsuan-Wen Wu // J Lipid Res. 2011. Vol. 52(4). P. 840–849.

2. MALDI-mass spectrometry imaging of desalted rat brain sections reveals ischemia-mediated changes of lipids / Hay-Yan J. Wang, Hsuan-Wen Wu, Ping-Ju Tsai & Cheng Bin Liu // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012. Vol. 404. P. 113–124.

3. MALDI imaging mass spectrometry of lipids by adding lithium salts to the matrix solution / Christopher D. Cerruti, David Touboul, Vincent Guérineau, Vanessa W. Petit, Olivier Laprévote & Alain Brunelle //Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011. Vol. 401. P. 75–87.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МРНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ SARS-COV-2 И ЕЕ ДОСТАВКА С ПОМОЩЬЮ КАТИОННОГО КОНЪЮГАТА ПОЛИГЛЮКИН: СПЕРМИДИН*

С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, М. Б. Боргоякова,
Е. А. Волосникова, А. В. Зайковская, О. В. Пьянков, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичев

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

E-mail: sharabrin.sv@gmail.com

Аннотация

мРНК-вакцины рассматриваются как одна из перспективных платформ по разработке вакцин, в том числе и против COVID-19. мРНК была синтезирована с матрицы ДНК, несущей ген RBD. После трехкратной иммунизации лабораторных животных в сыворотках были идентифицированы специфические антитела к RBD, обладающие вирус-нейтрализующей активностью.

мРНК-вакцины рассматриваются как одна из перспективных платформ по разработке вакцин против COVID-19. На данный момент в мире разрабатывается более 10 вариантов мРНК-вакцин против COVID и две из них оказались одними из первых препаратов, которые получили разрешение для широкомасштабного использования. Это разработки фармацевтических компаний Moderna/NIH и Pfizer/BioNTech.

Существенным преимуществом мРНК-вакцин является быстрое, недорогое, масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*. мРНК-вакцины способны эффективно активизировать оба звена иммунитета. Одной из проблем технологии мРНК-вакцин является ее доставка клеткам иммунной системы.

Целью исследования являлось получение экспериментальной мРНК вакцины, кодирующей фрагмент S белка SARS-COV-2 RBD (рецептор-связывающий домен), и использование конъюгата полиглюкин:спермидин в качестве способа ее доставки.

Синтез мРНК, кодирующей RBD, проводился с соответствующей матрицы — плазмидной ДНК, несущей ген RBD под контролем промотора фага T7. Для получения мРНК использовался набор T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CELLSCRIPT) согласно протоколу производителя. Для повышения стабильности мРНК и защиты от нуклеазной деградации была проведена работа по получению вариантов мРНК вакцины с использованием аналогов нуклеотидов (псевдоуридина), а также получению комплексов мРНК-RBD и конъюгата полиглюкин:спермидин (PGS) для доставки мРНК в клетки иммунной системы.

В ходе работы были оптимизированы условия для самосборки комплексов мРНК-PGS, включая подбор соотношений зарядов мРНК:PGS для образования комплексов (1 : 5). Полученные частицы были охарактеризованы по размеру (164 ± 20 нм) и поверхностному заряду (близок к нулевой точке). Для того, чтобы подтвердить образование наночастиц была проведена электронная микроскопия.

Для оценки иммуногенности мРНК-RBD-PGS использовали самок мышей BALB/c массой 16–18 г. Мышей иммунизировали трижды внутримышечно (в верхнюю часть бедра задней конечности) в дни 0, 21 и 35. На 48-й день у мышей брали кровь для анализа сыворотки на ELSISA и оценки вируснейтрализующей активности.

Оценка иммуногенности мРНК-RBD показала, что трехкратная внутримышечная иммунизация мышей голой мРНК-RBD (10 мкг на мышь), полученная с использованием псевдоуридина, не привела к значительному увеличению титра специфических антител по сравнению с отрицательным контролем (средний титр антител 1 : 50, n.s.). Трехкратная иммунизация мышей мРНК-RBD в оболочке PGS привела к индукции специфических антител, титры которых в ELISA были значительно выше по сравнению с отрицательным контролем (средний титр 1 : 5000, $p \leq 0{,}01$) и голой мРНК-RBD ($p \leq 0{,}05$). Сыворотка животных с высокими титрами антител против RBD обладала вируснейтрализующей активностью (средний титр 1 : 40).

Таким образом, в результате работы была получена экспериментальная мРНК вакцина, кодирующая ген белка RBD, способная индуцировать вирус-специфический иммунный ответ у лабораторных животных. Кроме того, используемый поликатионный полимер можно рассматривать как еще одно средство доставки мРНК-вакцин, в частности мРНК-вакцин против SARS-CoV-2.

© С. В. Шарабрин, А. П. Рудомётов, М. Б. Боргоякова, Е. А. Волосникова, А. В. Зайковская, О. В. Пьянков, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичев, 2021

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ 1-ГО И 2-ГО СЕРОТИПОВ*

Е. М. Шитик

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

E-mail: galanina_em@vector.nsc.ru

Аннотация

Аденоассоциированный вирус является ведущим средством доставки генно-инженерных конструкций к клеткам-мишеням ввиду своей безопасности использования. Однако, существует ряд ограничений, снижающих эффективность использования вирусных частиц на практике. В рамках данной работы была проведена модификация капсидов аденоассоциированных вирусов 1-го и 2-го серотипов с целью избегания процессов убиквитинирования и фосфорилирования внутри клетки. В результате было показано увеличение эффективности трансдукции для векторов, полученных на основе вирусов 2-го серотипа.

Аденоассоциированный вирус (ААВ) — это безоболочечный вирус из семейства парвовирусов, не имеющий собственных ферментов репликации и достигающий 20–25 нм в диаметре. С момента расшифровки генома ААВ 2 серотипа и создания первых рекомбинантных векторов на его основе, данный вирус стал ведущей платформой для доставки генотерапевтических препаратов *in vivo*. На 2021 г. проводится 263 клинических испытания препаратов на его основе, 32 из которых достигли III фазы. Такое широкое применение рААВ стало возможно благодаря уникальным свойствам данного вируса, обеспечивающим его безопасность применения. Рекомбинантный ААВ не является патогеном для клеток человека и не имеет возможностей для поддержания собственного жизненного цикла в условиях отсутствия вспомогательных вирусов — аденовируса или герпесвируса.

Несмотря на выраженные преимущества использования ААВ в качестве средства доставки генно-инженерных конструкций, существует ряд ограничений использования его на практике. Одним из таковых является подверженность вируса процессам убиквитинирования и фосфорилирования внутри цитоплазмы клеток-мишеней. Ввиду наличия гидроксильных групп основной мишенью для выполнения таких посттрасляционных изменений белков являются остатки аминокислот тирозина, находящиеся в области выступающих частей капсида аденоассоциированного вируса. С целью повышения эффективности трансдукции ААВ 1 и 2-го серотипов была проведена замена остатков аминокислот тирозина на фенилаланин. В рамках работы были использованы две плазмиды pDp1 и pDp2, содержащие ген Cap капсидов ААВ 1 и 2-го серотипов, соответственно. В область последовательности капсида вируса 1-го серотипа были внесены мутации Y445F и Y731F, а в область капсида 2-го серотипа были внесены Y444F, Y500F и Y730F. Трансдукция вирусных частиц выполнялась на линиях клеток HEK293, Hela и HepG2. Оценка эффективности трансдукции проводилась методом флуоресцентной микроскопии с оценкой свечения зеленого флуоресцентного белка EGFP. В результате было показано увеличение эффективности трансдукции ААВ 2-го серотипа на всех линиях клеток более чем в 10 раз. Для вирусных частиц ААВ 1-го серотипа значимого увеличения эффективности показано не было.

© Е. М. Шитик, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта Минобрнауки России (договор № 075-15-2019-1665).

РАЗРАБОТКА МИКРОЧИПА С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ РЕАГЕНТАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *AEROMONAS HYDROPHILA, AEROMONAS SALMONICIDA* И *YERSINIA RUKERI* В РЫБЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

П. В. Щепеникова[1], К. С. Захарова[1,2], А. О. Суворова[1]

[1] *ООО «Люмэкс-маркетинг», Санкт-Петербург*
[2] *Университет ИТМО, научно-исследовательский центр биоинженерии, Санкт-Петербург*

E-mail: ShchepenikovaPV@Lumex.ru

Аннотация

Предложено новое экспрессное решение по выявлению специфических последовательностей ДНК *Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida, Yersinia rukeri* с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в режиме реального времени, которое может быть использовано для диагностики распространенных бактериальных заболеваний рыб.

Своевременная диагностика бактериальных заболеваний рыб является актуальной задачей ихтиопатологической науки в связи с бурным развитием аквакультуры по всему миру. Для создания комплексного диагностического решения по определению бактериальных заболеваний рыб были выбраны следующие возбудители: *Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida, Yersinia rukeri*. Симптомы, вызванные данными патогенами, слабо дифференцируются друг от друга и от иных генерализованных заболеваний, при этом все поголовье инфицированных рыб может погибнуть в течение нескольких суток. Ввиду необходимости экспрессного анализа, актуальным является проведение ПЦР в рамках микрочипового подхода (например, с использованием микрочипового амплификатора АриаДНА), позволяющего достигнуть высокой скорости нагрева и охлаждения по сравнению с пробирочным подходом. В данной работе использовали 30-ячеистый микрочип из нержавеющей медицинской стали, поверхность которого была дополнительно пассивирована методом плазменной химической очистки (Diner, Pico). Кроме того, все необходимые реагенты для проведения ПЦР за исключением ПЦР-буфера были иммобилизированы внутри каждой ячейки. Итоговое время проведения анализа составило 35 мин.

В ходе работы предложено использовать подход мультиплексирования двух тест систем (ТС) в одной ячейке микрочипа. Помимо ТС возбудителя (канал 1, используемый флуоресцентный краситель FAM), был также выбран внутренний контроль — ген β-актина (канал 2, используемый флуоресцентный краситель ROX), позволяющий контролировать качество выделения нуклеиновых кислот из образца. Схема микрочипа приведена на рис. 1.

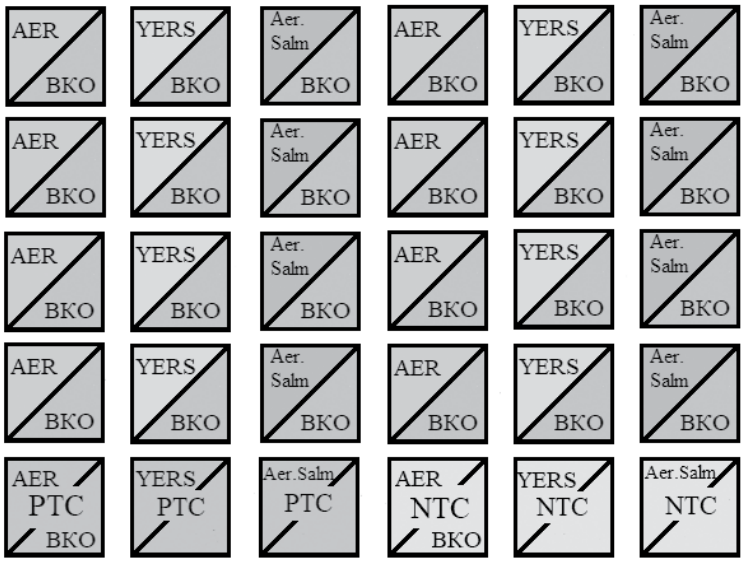


Рис. 1. Топология 30-и ячеистого микрочипа: AER — Aeromonas hydrophila, YERS — Yersinia rukeri, Aer. Salm — Aeromonas salmonicida, ВКО — внутренний контрольный образец, PTC — положительный контрольный образец, NTC — отрицательный контрольный образец

© П. В. Щепеникова, К. С. Захарова, А. О. Суворова, 2021

Иммобилизация ТС позволяет значительно сократить риск кросс-контаминации образцов при подготовке проб. В данной работе проводили лиофилизацию компонентов ПЦР смеси: праймеры и зонды ТС (Алкор-био, Россия), дНТФ (СибЭнзим, Россия), Taq-полимераза (СибЭнзим, Россия) в ячейках микрочипа с использованием смеси стабилизаторов на основе трегалозы, Tween-20 и ПВП. Результаты анализа приведены на рис. 2, 3.

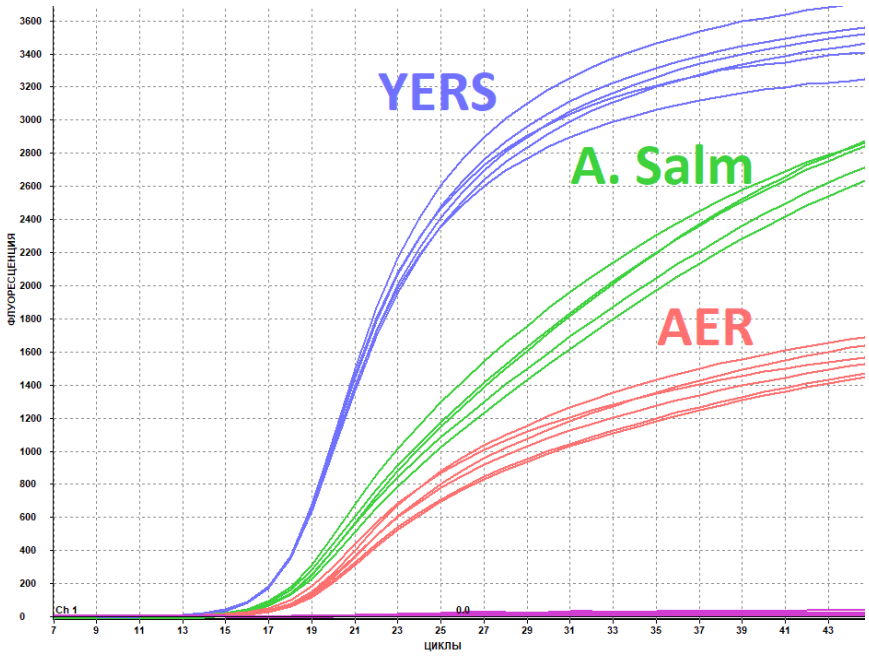


Рис. 2. Результаты анализа по первому каналу. Во всех образцах определены соответствующие возбудители

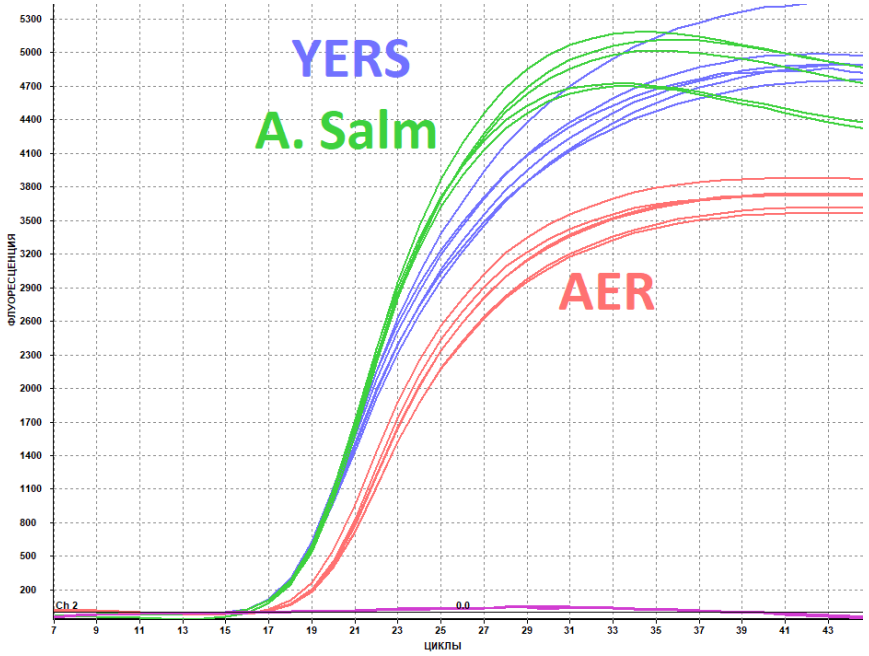


Рис. 3. Результаты анализа по второму каналу. Во всех образцах определен внутренний контроль

Для проверки работоспособности ТС были использованы синтетические плазмиды (Евроген, Россия, концентрация 10 пкг/мкл), содержащие вставки геномов исследуемых возбудителей, а также вставку последовательности, кодирующей синтез β-актина.

В дальнейшем планируется провести испытания данного диагностического решения на патматериале рыб, собранном с рыбных хозяйств Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

СПЕКТР МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С I И II СТАДИЯМИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

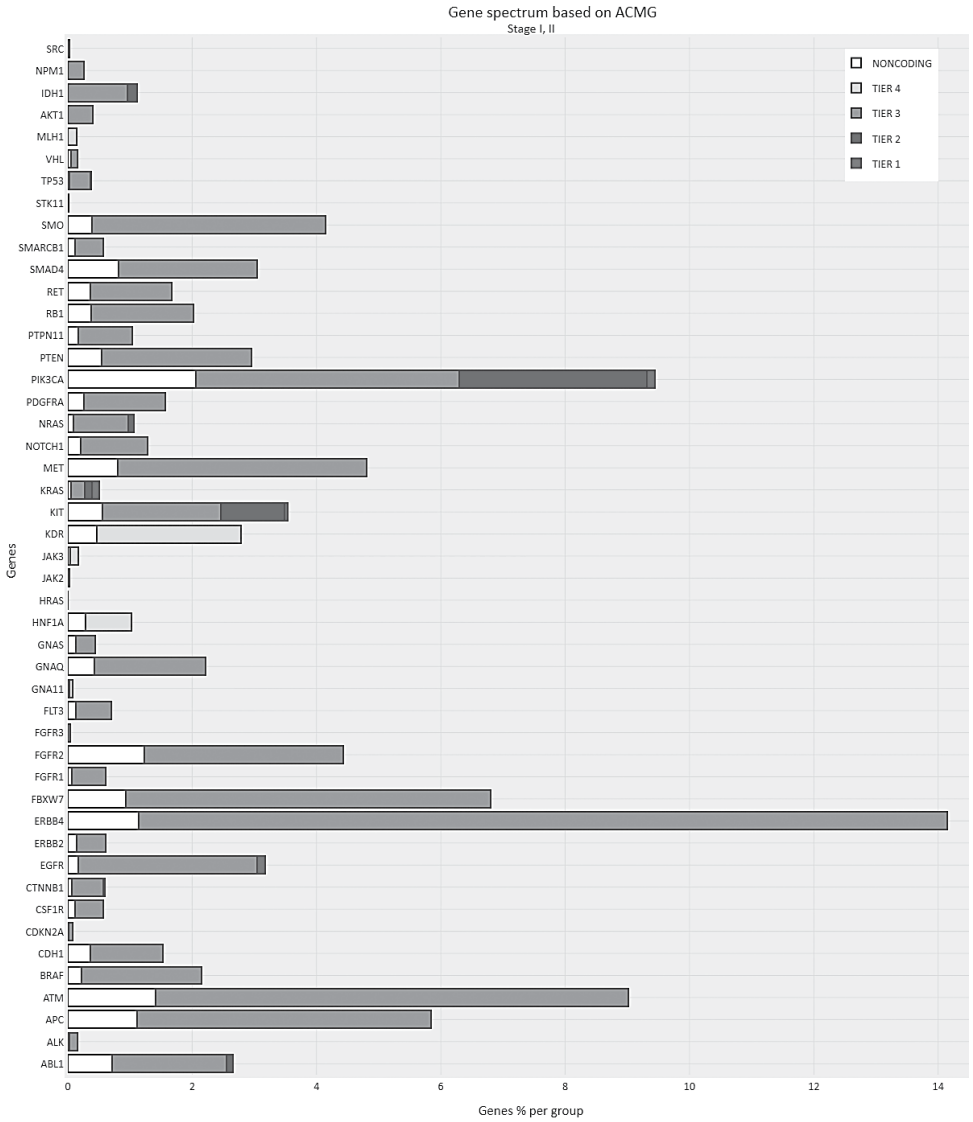
А. Н. Щаюк[1], Е. П. Михаленко[1], Н. А. Ефремов[1], М. Н. Шепетько[2], А. В. Кильчевский[1]

[1] *Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск*
[2] *Белорусский государственный медицинский университет, Минск*

E-mail: a.shchayuk@igc.by

Аннотация
С помощью технологии секвенирования «нового поколения» изучен спектр мутаций и их клиническая значимость у пациентов с немелкоклеточным раком легкого на I и II стадиях. Варианты с высокой и потенциальной клинической значимостью наиболее часто выявлены в генах *PIK3CA*, *EGFR*, *KRAS*, *KIT*, *STK11*, *IDH1* и *ABL1*.

Рак легкого является одним из самых распространенных злокачественных новообразований и лидирующей причиной смерти пациентов мужского пола. Наиболее часто (85 %) встречается немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Большое значение приобретает изучение молекулярно-генетических особенностей опухоли, что позволяет выявить мутации, являющиеся прогностическими и диагностическими маркерами развития и течения заболевания. Цель исследования: изучить спектр мутаций у пациентов с НМРЛ на I и II стадиях заболевания.



Спектр мутаций у пациентов с I и II стадиями НМРЛ

© А. Н. Щаюк, Е. П. Михаленко, Н. А. Ефремов, М. Н. Шепетько, А. В. Кильчевский, 2021

Выборку составили 80 пациентов с I и II стадией НМРЛ, находившихся в Минском городском онкологическом диспансере с 2012 по 2019 гг. Сбор материала проводился с соблюдением принципов добровольности, конфиденциальности и разрешением этического комитета. ДНК из опухолевой ткани выделяли путем гомогенизации с лизирующим буфером, инкубации при 56 °С с протеиназой К и стандартной фенол-хлороформной экстракции. Проверку качества ДНК осуществляли флуорометрическим методом на Quantus Fluorometer (Promega, USA). Пробоподготовку ДНК для анализа проводили с использованием наборов TruSeq Amplicon Cancel Panel и AmpliSeq for Illumina Cancer HotSpot Panel v2 в соответствии с инструкцией фирмы-производителя на приборах MiSeq и NextSeq (Illumina, USA). Полученные данные в виде fastq-файлов подвергали биоинформатическому анализу: предварительная обработка fastq с помощью FastP, BAM-файлы упорядочивали с использованием ABRA2, обрезали праймеры с помощью BamClipper, дубликаты не удаляли. Обрезанные данные сопоставляли с GRCh38. Для «вызова вариантов» использовали VarDict в режиме Amplicon. Интерпретацию вариантов и информацию о клинической значимости мутаций получали с использованием рекомендаций ACMG (The American College of Medical Genetics and Genomics).

На рисунке представлен полученный спектр мутаций. Обнаружены варианты, имеющие высокое клиническое значение (tier 1) в исследуемой выборке пациентов: *PIK3CA* p.Glu545Lys (0,14 %), *EGFR* p.Glu746_Ala750del, p.Asn771dup (0,13 %), *KRAS* p.Gly13Val, p.Gly13Asp, p.Gly12Ala, p.Gly12Val, p.Gly12Asp, p.Gly12Cys (0,12 %), *KIT* p.Phe591Leu (0,04 %) и *STK11* p.His27Pro, p.Arg40Cys, p.Tyr60Cys, p.Ser69Thr, p.Thr71Ala (0,01 %). Среди вариантов с потенциальной клинической значимостью (tier 2) чаще всего встречаются миссенс-мутации и мутации сдвига рамки считывания в генах *PIK3CA* (3,01 %), *KIT* (1,02 %), *IDH1* (0,16 %), *KRAS* (0,12 %) и *ABL1* (0,1 %). Наибольшую долю среди обнаруженного спектра мутаций составляют варианты с неопределенной клинической значимостью (tier 3): миссенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания и остановки синтеза белка, а также сплайсинг-мутации в генах *ERBB4* (13,0 %), *ATM* (7,6 %), *FBXW7* (5,9 %), *APC* (4,72 %), *PIK3CA* (4,2 %), *MET* (4,0 %), *SMO* (3, %), *FGFR2* (3,2 %), *EGFR* (2,9 %), *PTEN* (2,4 %), *SMAD4* (2,2 %), *BRAF* (1,9 %). Кроме того, встречаются другие кодирующие мутации (tier 4): 2,3 % в гене *KDR,* 0,7 % в гене *HNF1A*, 0,14 % в гене *MLH1* и мутации в некодирующих регионах.

Таким образом, с использованием технологии секвенирования «нового поколения» получены данные о спектре мутаций и их клинической значимости для пациентов с I и II стадиями немелкоклеточного рака легкого, что позволит учитывать молекулярно-генетические особенности опухоли при диагностике, подборе лекарственных препаратов и прогнозе течения заболевания.

ADVANCED DNA MACHINE FOR THE AMPLIFICATION FREE DETECTION OF SARS-HCOV-2 IN THE CLINICAL SAMPLES

A. A. Eldeeb [1], S. Zablotskaya [1], M. S. Rubel[1], M. A. Y. Nour, D. M. Kolpashchikov [1,2]

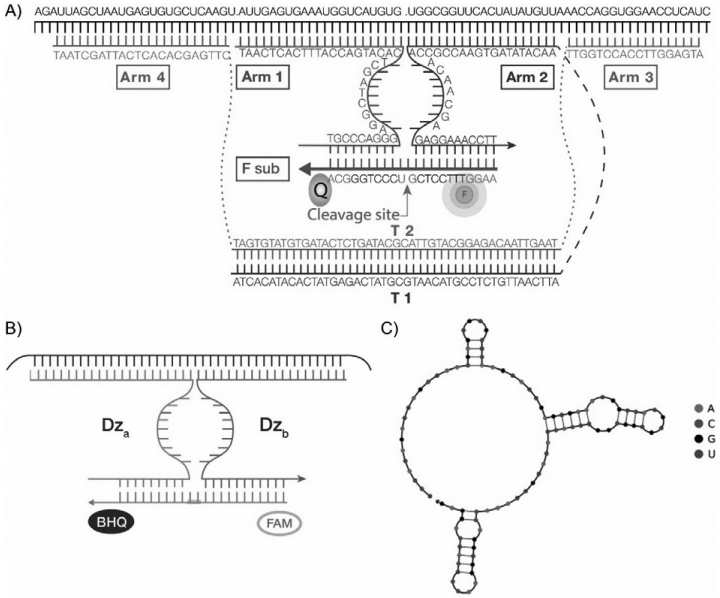
[1] *National Research University ITMO, International Scientific Center SCAMT*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

E-mail: eldeeb@scamt-itmo.ru

Abstract

Notwithstanding the greater sensitivity of the DNAzymes in comparison with molecular beacons and other hybridization probes, it's still not satisfying for the viral diagnosis due to the insufficient LOD. In this study, we present an advance DNAzyme-based machine with LOD 1 pM. In a trial to facilitate the competition with the RT-qPCR.

RNA viruses are highly mutable. Consequently, it seldom leads to more dangerous symptoms [1]. The early detection of viruses helps for better epidemiological control. Nevertheless, it is challenging because of the cost and complexity of the detection process. Currently, real time PCR (qPCR) is most commonly used in molecular diagnostics. This technique is trusted and reputable but still requires complex equipment and expensive reagents.

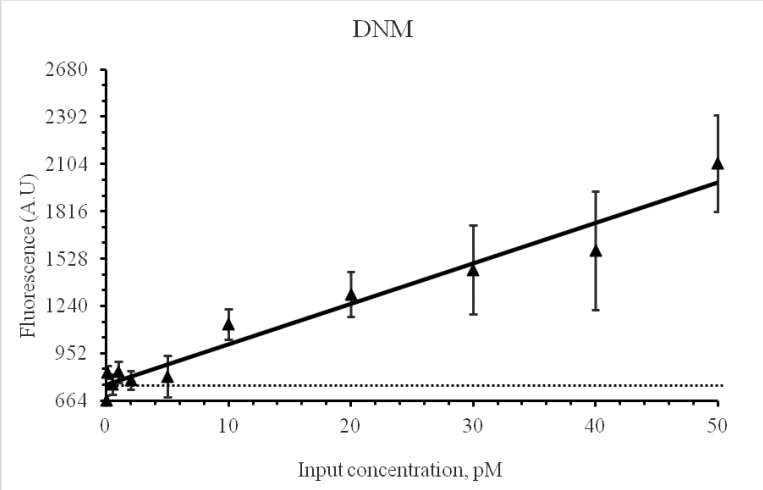


The Advanced 4 Arms DNA Machine consist of 3 main parts the separated Arm 1, T1, and T2. T1 contains arm 2 while T2 has 2 arms (3 and 4) both are connected with spacers to Tile 2. Both T1 and T2 are complementary to each other to form a double stranded platform that holds all the three arms together

The novel generation of the DNAzymes (Advanced-DNA Machines) is the light of hope that can open the door for changing diagnostics of viral infections to be much simpler and cost efficient. DNAzymes are proving promising development and progress in the last few years beginning from a developed probe to the binary DNAzyme [2]. The DNAzyme (10–23) is a DNA oligonucleotide that has enzymatic activity, for a particular sequence because of its catalytic core that can be set after hybridization of the binding arms to that sequence. Binary DNAzyme probe consists of a couple of separate strands that hybridize to the analyte (the particular region in the viral RNA sequence) and form the catalytic core followed by binding and cleaving fluorogenic reporter substrate (F-sub). One more significant advantage of the deoxyribozyme is that it magnifies the signal: a single molecule of the viral RNA analyte will support one copy of the DNAzyme to break a lot of F-sub molecules. Besides, the binary Deoxyribozyme proves high selectivity of nucleic acid identification in comparison with conventional hybridization probes. Still, the binary DNA zyme (10–23) has disadvantages with the sensitivity over the long RNA analytes that undergo self-folding and forms stable secondary structures. We aimed to transform a binary deoxyribozyme probe into an advanced DNA machine by joining two extra binding arms, three of which are linked to a shared double-stranded DNA platform. this DNA machine can unwind the folded RNA secondary structures by a total

© A. A. Eldeeb, S. Zablotskaya, M. S. Rubel, M. A. Y. Nour, D. M. Kolpashchikov, 2021

of 4 binding arms. Sensitivity was successfully enhanced, and the Developed DNA-Machines showed high activity and sensitivity with limit of detection below 1 pM, which is 20 times lower than that of Binary Deoxyribozyme [3]. This made it easier to try the viral detection directly in the clinical samples with no any kind of amplification.



Limit of detection of the 4DNM, the reaction was incubated at 55 °C for 3 h, followed by fluorescence spectrophotometry recording and analyzing. The data are average values of three independent experiment

References

1. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation // Cell. Mol. Life Sci. 2016. Vol. 73. № 23. P. 4433–4448.

2. Kolpashchikov D. M. Evolution of Hybridization Probes to DNA Machines and Robots // Accounts of Chemical Research. 2019. № 7 (52). С. 1949–1956.

3. Gerasimova Y. V., Cornett E., Kolpashchikov D .M. RNA-Cleaving Deoxyribozyme Sensor for Nucleic Acid Analysis: The Limit of Detection // Chembiochem Eur. J. Chem. Biol. 2010. Vol. 11. № 6. P. 811–729.

COOPERATIVITY FOR CANCER TREATMENT: A THRESHOLDING DNA LOGIC GATE THAT IS ACTIVE AT HIGH CONCENTRATIONS OF CANCER MARKER RNA

A. A. Eldeeb [1], C. Patra [1], D. D. Nedorezova [1], D. M. Kolpashchikov [1,2]

[1] *SCAMT Laboratory, ITMO University, St. Petersburg*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

*E-mail: christina@scamt-itmo.ru

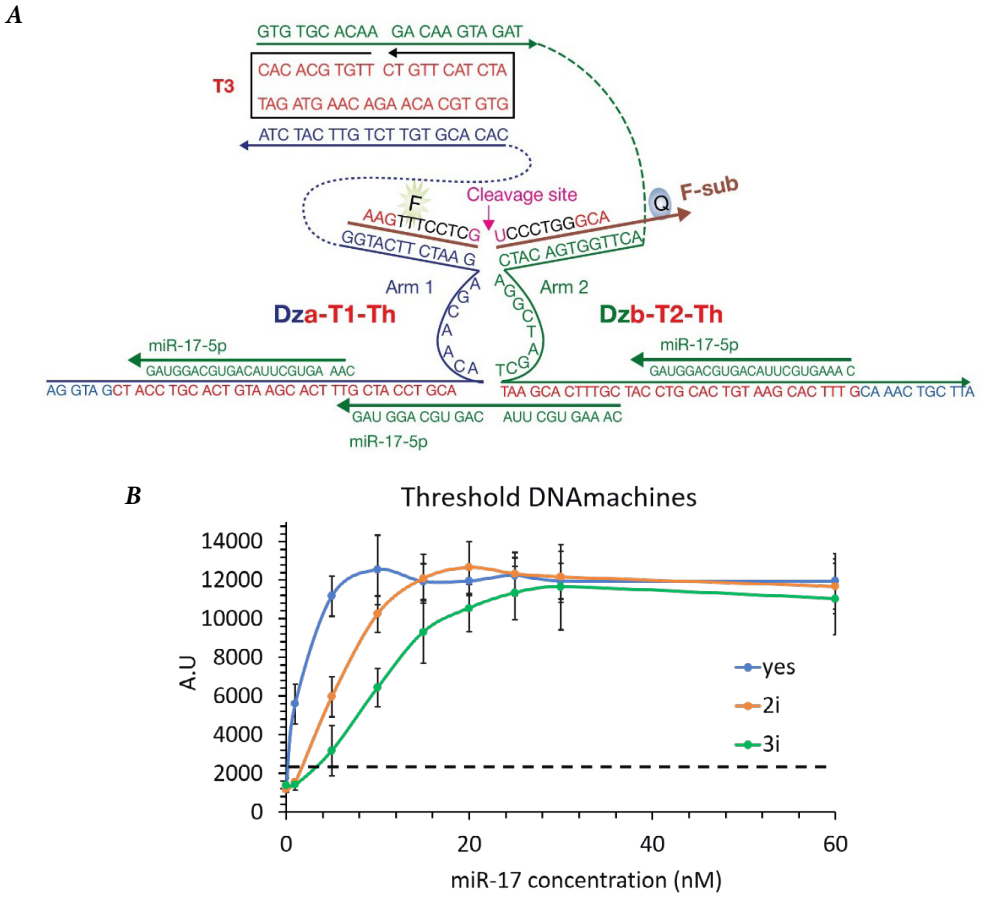
Abstract

Our prototype thresholder gate, based on Dz technology, was previously presented. The DTh sensor's main advantage was that it gets activated only in presence of high cancer marker concentrations while cleaving another target RNA. In current study, we introduce the idea of DTh nanomachines — a construct that holds all DTh's functional units attached to a common dsDNA platform — aiming to further increase the cleavage activity.

The International Agency of Research on Cancer predicts that by 2040 the number of new cancer cases and mortality worldwide will rise to +56,7 % and +63,7 %, respectively. With the cancer burden rising, we need more efficient therapeutics.

Gene expression modification or manipulation to alter the biological properties of living cells is a promising technique to be used in cancer therapeutics. Oligonucleotide gene therapy agents (OGTs) with gene silencing abilities are considered a great anticancer tool. One significant problem of OGTs is the off-target effect due to low selectivity of the agents against malignant cells.

To address this problem, we develop a nanodevice which will demonstrate high selectivity against malignant cells by analyzing a complex pattern of cancer markers, be autonomously activated upon analyte/target molecule recognition, manipulate analyte/target molecule structure, and cleave multiple copies of the desired target molecule. In this regard, we developed a DNA thresholder gate (DTh) activated by cancer marker RNA sequence in concentration-dependent manner to cleave vital RNAs[1].



Predicted secondary structure of: A — Tiled DNA nanomachine cleaving F-sub; B — Quantification of F-sub cleavage. Fluorescent response of DTh constructs to increasing concentrations of miR17

* © A. A. Eldeeb, C. Patra, D. D. Nedorezova, D. M. Kolpashchikov, 2021

Our two DTh variants were constructed based on the binary 10–23 Dz sensor model[2]. They were tailored to recognize miR17 as analyte and mRNA-46 as cleaving target. mRNA-46 is a transcript of DAD1, a housekeeping gene crucial for cell survival. DTh was activated by miR17 a concentration above 1–2 nM as expected followed by undesirable drop in the activity at mirR17 concentrations above 20–30 nM. DThs deactivation by high concentrations of the analyte was an important drawback. It was explained by partial decomposition of the catalytic complex, by the excess amount of cancer marker. The current work resolves this problem by integrating a common tile-attached platform, Additionally, the dsDNA platform can accommodate additional RNA unwinding arms. The hypothesis was that this reformation would: i) assist greater cooperativity of the various nanomachine components preventing collapse, and ii) unfold the secondary structure of the target RNA thus, facilitating easier DTh/RNA binding and thereby increasing the reaction rate as well as potentially enhance the selectivity of the nanomachine towards the target molecule[3]gene therapy (GT).

Introducing the tile sequence improved the cleavage rate and prevented the partial decomposition of our machine. The additional RNA unwinding arms impacted our enzymatic complex. Fine tailoring is needed in order to reform these arms' sequence and achieve optimum interaction stability during the cleavage and product release steps of the catalytic cycle. It was found that our enzymatic system is highly cooperative, and the slightest alterations affect significantly its RNA cleaving activity.

References

1. Gomes A. G. de Oliveira, Dubovichenko M. V., Eldeeb A. A. et al. // ChemBioChem. 2021, DOI 10.1002/cbic.202000769.
2. Mokany E., Bone S. M., Young P. E. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132. P. 1051–1059.
3. Nedorezova D. D., Fakhardo A. F., Nemirich D. V. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2019. Vol. 58. P. 4654–4658.

ПОИСК РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ПРОФИЛЕМ МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*

П. С. Ямщиков[1], М. Р. Патышева[1,2], Е. О. Казакова[1], И. В. Ларионова[1,2], Ю. Г. Кжышковска[1]

[1] Томский государственный университет
[2] Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

E-mail: mriamshchikovpavel@gmail.com

Аннотация

Моноциты могут в значительной степени влиять на опухолевую прогрессию, являясь предшественниками таких ключевых клеток микроокружения, как опухолеассоциированные макрофаги. Однако, особенности транскриптомного профиля моноцитов онкологических больных мало изучены, отсутствуют сведения о прогностической роли маркеров моноцитов. В данной работе провели поиск различий в транскрипционном профиле моноцитов между больными колоректальным раком и раком молочной железы.

Колоректальный рак (КРР) и рак молочной железы (РМЖ) занимают лидирующие позиции в системе онкологических заболеваний. Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) вносят существенный вклад в прогрессию опухоли при данных локализациях. Ряд исследований указывают на двойственную роль ОАМ при РМЖ и КРР. ОАМ имеют проопухолевую роль при РМЖ и противоопухолевую роль при КРР. Так как большинство ОАМ происходят из мигрирующих в опухоль моноцитов, транскрипционный профиль последних может влиять на программирование ОАМ в про- или противоопухолевый фенотип. Показано, что моноциты вносят вклад в рост опухоли и метастатическую диссеминацию [1, 2].

Объектом исследования являются моноциты периферической крови больных КРР и РМЖ. Материал исследования был собран на базе клиники НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местным комитетом по медицинской этике НИИ Онкологии ТНИМЦ. Секвенирование проводилось на приборе Illumina NextSeq 500. Контроль качества и фильтрацию от некачественных прочтений проводили с помощью программ FastQC и fastp. Картирование прочтений на геном проводили в STAR 2.5. При помощи программы QoRTs получили матрицу экспрессии. Далее при помощи программного пакета DESeq2 в среде R, получали данные о дифференциальной экспрессии генов между двумя исследуемыми группами. При помощи программ fgsea и clusterProfiler проводили обогащение по биохимическим и регуляторным путям. Использовали базы данных Hallmark gene sets, Reactome, KEGG и GO.

Получили 43 транскрипта с повышенной экспрессией в группе больных КРР и 13 транскриптов с повышенной экспрессией в группе больных РМЖ (FDR <0,25). Небольшое количество дифференциально экспрессирующихся транскриптов говорит о малой разнице транскрипционного профиля моноцитов между больными КРР и РМЖ. Однако, после проведения анализа обогащения генов по их функциональным путям (GSEA) удалось найти значительные различия между сигнальными и функциональными путями у моноцитов исследуемых групп. В моноцитах больных КРР преимущественно активируется программа воспаления, HSF1 зависимый функциональный путь, который вовлекается в дифференцировку моноцитов в макрофаги [3], однако в то же время активируется сигнальный путь P38 MAPK, который связывают с активацией противовоспалительной программы в макрофагах [4], В моноцитах больных РМЖ активируется хемотаксис моноцитов, MTORC1 сигнальный путь, который связывают с активацией в макрофагах выработки противовоспалительных и ростовых факторов [5], что может значительно способствовать опухолевой прогрессии, также активируется эндоцитоз.

Из полученных результатов видно, что несмотря на небольшую разницу между экспрессирующимися транскриптам, моноциты больных КРР и РМЖ имеют значительные различия между функциональными и сигнальными путями, что, в свою очередь, может отражать различную роль ОАМ в прогрессии КРР и РМЖ.

Литература

1. Asai A., Yasuoka H., Matsui M. et al. Programmed Death 1 Ligand Expression in the Monocytes of Patients with Hepatocellular Carcinoma Depends on Tumor Progression // Cancers (Basel). 2020. Vol. 12(8). P. 2286. Published 2020 Aug 14. URL: doi:10.3390/cancers12082286/

© П. С. Ямщиков, М. Р. Патышева, Е. О. Казакова, И. В. Ларионова, Ю. Г. Кжышковска, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 19-15-00151 и стипендии Президента РФ на 2021-2023 гг. в рамках проекта «Определение ключевых параметров иммунного статуса опухоли по циркулирующим моноцитам с целью персонификации противоопухолевой терапии».

2. Zhang H., Yu Y., Zhou L. et al. Circulating Tumor Microparticles Promote Lung Metastasis by Reprogramming Inflammatory and Mechanical Niches via a Macrophage-Dependent Pathway // Cancer Immunol Res. 2018/ Vol. 6(9). P. 1046–1056. URL: doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0574.

3. Jego G., Lanneau D., De Thonel A. et al. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes // Leukemia. 2014. Vol. 28(8). P. 1676–1686. URL: doi:10.1038/leu.2014.63

4. Jiménez-Garcia L., Herránz S., Luque A., Hortelano S. Critical role of p38 MAPK in IL-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages // Eur J Immunol. 2015. Vol. 45(1). P. 273–286. URL: doi:10.1002/eji.201444806.

5. Li Q., Cheng H., Liu Y. et al. Activation of mTORC1 by LSECtin in macrophages directs intestinal repair in inflammatory bowel disease // Cell Death Dis. 2020. Vol. 11(10). P. 918. Published 2020 Oct 26. URL: doi:10.1038/s41419-020-03114-4.

II

КОМБИНАЦИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕЛКА CAS9 И МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9*

Е. А. Ахметова[1], Н. А. Логвина[1], О. В. Сергеева[1], Т. С. Зацепин[1,2]

[1] *Сколковский институт науки и технологий, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E-mail: Elizaveta.Akhmetova@skoltech.ru

Аннотация

Наиболее ярким достижением в области редактирования генома, отмеченным Нобелевской премией, является открытие системы CRISPR/Cas9. Однако неспецифическое расщепление ДНК — существенный недостаток метода для его применения в биомедицине. Цель нашего исследования — улучшить безопасность и эффективность геномного редактирования системой CRISPR/Cas9.

Модификация нуклеиновых кислот является стандартным способом повышения стабильности синтетических олигонуклеотидов в клетке, в том числе и направляющих РНК (crРНК) для CRISPR-систем. На сегодняшний день широко используются 2′-F, 2′-OMe и тиофосфатные модификации. На основе опубликованных паттернов этих модификаций для crРНК (Mir et al, 2018) мы синтезировали библиотеки crРНК к генам gfp и pcsk9 (пропротеиновая конвертаза), содержащие как известные химические модификации, так и новые одиночные N-(алкансульфонил)фосфамидные группы (мезил и бузил). Проверка эффективности разрезания мишеней нуклеазой Cas9 и ее активными мутантными формами Sniper (Lee et al, 2018) и Hi-Fi (Vakulskas et al, 2018) показала наличие участков в направляющей РНК, толерантных к новым модификациям. Введение нескольких мезильных модификаций в эти участки также не влияет на эффективность разрезания ДНК нуклеазой. Введение более объемной бузильной модификации приводит к снижению эффективности разрезания мишеней по сравнению с мезильной модификацией. На основе полученных результатов проведен дизайн и синтез направляющих РНК со множественными мезильными и бузильными модификациями для дальнейшей работы.

Таким образом, мы определили участки в направляющей РНК, модификация которых мезильными и бузильными группами с целью увеличения стабильности не приводит к снижению эффективности разрезания мишени нуклеазой. Совместное использование высокоточных мутантных форм нуклеазы Cas9 и новых химических модификаций РНК позволит улучшить точность геномного редактирования при минимальном снижении эффективности как *in vitro*, так и *in vivo*.

© Е. А. Ахметова, Н. А. Логвина, О. В. Сергеева, Т. С. Зацепин, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00298.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА (IR) *

А. А. Гавриленкова[1,2], О. В. Серова[2,3], Е. А. Ганцова[2], А. С. Горященко[2], А. Г. Петренко[2], Э. В. Бочаров[2], И. Е. Деев[2,3]

[1] Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[2] Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
[3] Научно-технологический университет «Сириус», Сочи

E-mail: alycat1008@gmail.com

Аннотация

Рецептор инсулина принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые играют ключевую роль в развитии и дифференцировке клеток. RTKs состоят из трех частей: внеклеточной части, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранного домена (ТМ) и внутриклеточной части, участвующей в фосфорилировании субстратов. На данный момент проводится много исследований по изучению механизмов активации и передачи внутриклеточного сигнала семейства рецепторов инсулина, но точные механизмы конформационных изменений рецепторов при их активации до сих пор неизвестны. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулина находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда конформация рецептора меняется, и в результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Для изучения роли трансмембранного домена в активации рецептора IR нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие двойные замены в трансмембранном домене. Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IR с заменами I971E–F972R; F976E–S977R; I980E–G981R. Затем клетки инкубировали в среде F-12 с добавлением 400 мкМ инсулина; клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к фосфорилированной и общей форме рецептора.

В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутации F976E–S977R, I980E–G981R не влияли на характер активации рецептора. Двойная замена I971E–F972R приводила к фосфорилированию рецептора в отсутствии лиганда, в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии инсулина. Мы предполагаем, что двойная замена I971E–F972R приводит к стабилизации димера рецептора в активной конформации за счет образования солевых мостиков между аргинином и глутаминовой кислотой в трансмембранном домене и, как следствие, к автофосфорилированию внутриклеточных частей рецептора в отсутствии лиганда.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет большую роль в активации IR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности могут приводить к изменению характера активации рецептора.

© А. А. Гавриленкова, О. В. Серова, Е. А. Ганцова, А. С. Горященко, А. Г. Петренко, Э. В. Бочаров, И. Е. Деев, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) гранты № 19-04-01042, 19-34-51034.

ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ КАК ДОСТАВЛЯЮЩИЕ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9*

Н. А. Данилин[1–3], О. А. Семиколенова[1,3], Д. В. Ким[1], В. М. Голышев[1], М. И. Мещанинова[1,3], Д. С. Новопашина[1–3]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*
[3] *Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*

E-mail: n.danilin@g.nsu.ru

Аннотация

Введение пептидов в олигонуклеотидные конструкции является перспективным подходом к улучшению их способности проникать через клеточную мембрану. Мы предлагаем использовать комплекс пептидного конъюгата дополнительного олигонуклеотида с направляющей crРНК системы CRISPR/Cas9 для ее доставки. Для введения пептидов использовался разработанный нами ранее подход, основанный на тиол-малеимидной конденсации малеимид-модифицированного олигонуклеотида с цистеинсодержащим пептидом.

Пептиды, их комплексы и конъюгаты с нуклеиновыми кислотами широко используются для доставки в клетки. Разработка подхода к доставке синтетических направляющих РНК в системе геномного редактирования CRISPR/Cas9 является актуальной задачей. Мы предлагаем использовать дополнительный олигонуклеотид, комплементарный направляющей crРНК и содержащий пептид, облегчающий проникновение через клеточную мембрану. На основе литературных данных были выбраны пептиды, в состав которых был добавлен остаток цистеина на N- или C-конец (рис. 1).

Целью нашей работы является дизайн и синтез пептидных конъюгатов дополнительных доставляющих олигонуклеотидов и исследование их способности формировать комплексы с направляющими РНК (на примере crРНК) и проникать в клетки.

CRLARAGLAQ	Złotek U. et al. Molecules 2020, 25, 2492
CYARVRRRGPRGYARVRRRGPRR **YARVRRRGPRGYARVRRRGPRRC**	Wesolowski D. et al. PNAS 2011, 108, 16582
CHHHHHRRWQWRHHHHH	Lee H.-J. et al. Sci. Rep. 2019, 9, 9398
CRGDKRGDK	Kazuki N. et al. Cancer Cell. 2009, 16, 510
CRGWEVLKYWWNLLQY	Kwon E. J. et al. Bioconjug. Chem. 2008, 19, 920
RGWEVLKYWWNLLQYC	Kwon E. J. et al. Mol. Pharm. 2010, 7, 1260

Рис. 1. Структуры использованных пептидов, облегчающих доставку олигонуклеотидных конструкций в клетку

Для введения пептидов на 3'-конец олигодезоксирибонуклеотида нами был использован подход, основанный на введении остатка малеимида и его последующем взаимодействии с тиолсодержащим пептидом [1, 2] (рис. 2). Строение полученных конъюгатов доказывалось методами масс-спектрометрии.

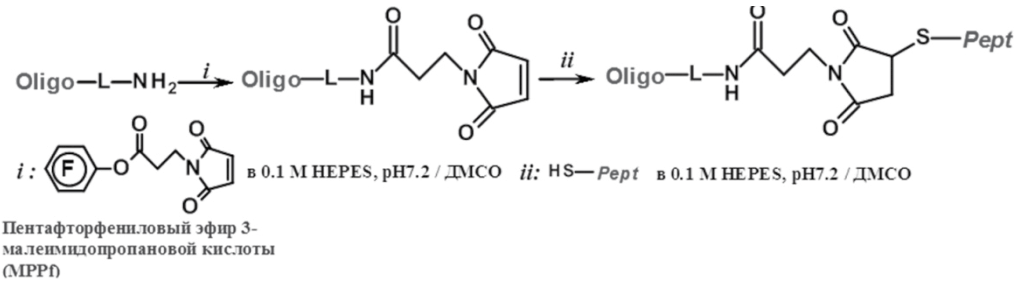


Рис. 2. Схема присоединения пептидов (Pept) к дополнительному олигодезоксирибонуклеотиду (Oligo)

© Н. А. Данилин, О. А. Семиколенова, Д. В. Ким, В. М. Голышев, М. И. Мещанинова, Д. С. Новопашина, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-51026 и проекта базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук 0245-2021-0007.

Методами термической денатурации и задержки в геле продемонстрировано, что введение доставляющих пептидов влияет на их способность образовывать комплексы с направляющей crРНК. Исследована способность комплексов направляющей crРНК с доставляющими олигонуклеотидами проникать в клетки.

Использование пептидных конъюгатов в сочетании с предложенным нами ранее подходом к созданию фотоактивируемой системы CRISPR/Cas9 [3] позволит создать фотоконтролируемую систему геномного редактирования, способную эффективно проникать в клетки.

Литература

1. Novopashina D. S. et al. Frontiers in Pharmacology. 2019. Vol. 10. P. 813.
2. Danilin N. A. et al. Russian J. Bioorg. Chem. 2019, Vol. 45, No. 6, P. 824–831. DOI: 10.1134/S106816201906013X.
3. Ахметова Е. А. и др. Биоорган. химия. 2021. Т. 47. № 2. С. 276–286.

РЕАКЦИЯ ЯДЕР БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА ВВЕДЕНИЕ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ: ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА В

А. С. Дятлова, Е. Э. Нестерко

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

E-mail: anst.diatlova@gmail.com

Аннотация

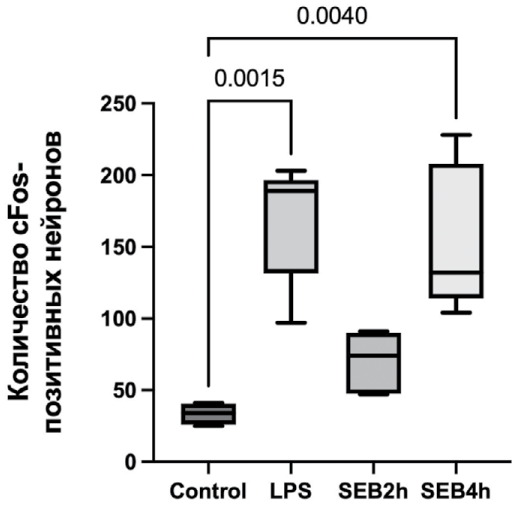
На мембране парасимпатических нервов и их окончаниях экспрессируются рецепторы к цитокинам, что дает основание рассматривать парасимпатическую систему как один из посредников при обмене информацией между иммунной и нервной системами. 80 % волокон блуждающего нерва являются афферентными, передающими информацию о висцеральной чувствительности ядрам, расположенным в продолговатом мозге. В данной работе определены реакции ядра солитарного тракта на интраперитонеальное введение Т-независимого (липополисахарид) и Т-зависимого (стафилококковый энтеротоксин В) антигенов.

Блуждающий нерв (n. vagus) рассматривают в качестве одного из посредников передачи информации от иммунной системы к нервной [1]. Ядро солитарного тракта (NTS), расположенное в продолговатом мозге, относят к дорзальному вагальному комплексу, интегрирующему восходящие сенсорные сигналы от висцеральных органов и нисходящие стимулы от различных структур головного мозга, в частности, гипоталамуса [2]. При попадании инфекции в организм, цитокины, высвобождаемые активированными иммунными клетками, воздействуют на мозг, вызывая реакции острой фазы. При изучении нейроиммунных взаимодействий для моделирования активации врожденной иммунной системы используют введение аналогов патогенов, таких как липополисахарид (ЛПС или эндотоксин), компонент грамотрицательной бактериальной клеточной стенки, или токсины белковой природы, такие как стафилококковый энтеротоксин В (SEB) [3, 4]. Цель данной работы — охарактеризовать реакции ядра NTS на введение антигенов (ЛПС и SEB), используя маркер активации нейронов, белок cFos [5].

Работа выполнена на 15 самцах крыс линии Wistar (200-250 г), разделенных на экспериментальные группы: контроль (введение физиологического раствора); введение ЛПС в дозе 500 мкг/кг; введение SEB в дозе 500 мкг/кг. Спустя 2 и 4 часа после введения ЛПС и SEB соответственно животных выводили из эксперимента путем транскардиальной перфузии для последующего выделения и фиксации головного мозга. Затем изготавливали криостатные срезы продолговатого мозга и, после иммуногистохимического окрашивания, проводили анализ его результатов. Количество cFos-позитивных нейронов определяли с помощью ПО «ВидеоТест Морфология 5.2». Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ и post-hoc критерий Данна в ПО GraphPad Prism.

Установлено, что через 2 часа после введения ЛПС происходит увеличение количества cFos-позитивных нейронов по сравнению контролем (см. рисунок). Через 2 часа после введения SEB количество cFos-позитивных нейронов статистически не отличается от контроля, но через 4 часа после введения SEB происходит увеличение количества cFos-позитивных нейронов в ядре NTS.

Таким образом, продемонстрирована активация нейронов ядра блуждающего нерва NTS в ответ на введение как LPS, так и SEB. Установлено, что активация нейронов в ответ на SEB происходит медленнее по сравнению с ответом на LPS, что, вероятно, связано с различными механизмами действия исследуемых антигенов. LPS как Т-независимый антиген действует напрямую на TLR4, стимулируя выработку цитокинов и быстрое развитие воспаления. SEB при попадании рекрутирует Т-клетки, связываясь с Т-клеточными рецепторами (TCR) и образуя тройной комплекс с TCR



Количество cFos-позитивных нейронов в ядре NTS у крыс с введением антигенов и в контрольной группе. 69 уровень мозга [6] ($p < 0,05$)

© А. С. Дятлова, Е. Э. Нестерко, 2021

и MHCII на поверхности антиген-презентирующих клеток, вызывая сильное, но отложенное по времени воспаление [7].

Литература

1. Корнева Е. А. Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22(3). С. 405–418.

2. Grill H. J., Hayes M. R. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake // Int. J. Obes. Lond., 2009. Suppl 1. P. 11–5. DOI: 10.1038/ijo.2009.10.

3. Lewis A. J., Seymour C. W., Rosengart M. R. Current Murine Models of Sepsis // Surgical Infections. 2016. Vol. 4 (17). P. 385–393.

4. Goehler L. E., Gaykema R. P., Hansen M. K. et al. Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-Fos expression, and serum corticosterone in rats // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001. Vol. 280(5):R1434-9. DOI: 10.1152/ajpregu.2001.280.5.R1434.

5. Chung L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal // Dev. Reprod. 2015. Vol. 19(2). P. 61–67.

6. Swanson L. W. Brain maps: Structure of the rat brain. A laboratory guide with printed and electronic templates for data, models and schematics // Elsevier. Amsterdam, 2004. 3rd ed.

7. Rödström K. E., Elbing K., Lindkvist-Petersson K. Structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin B in complex with TCR and peptide-MHC demonstrates absence of TCR-peptide contacts // J. Immunol. 2014. Vol. 193(4). P. 1998–2004.

АНТИТЕЛА С ГИДРОЛИТИЧЕСКИМИ АКТИВНОСТЯМИ КАК МАРКЕРКЕРЫ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ *

Е. А. Ермаков, Г. А. Невинский, В. Н. Бунева

[1] *Новосибирский государственный университет*
[2] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

E-mail: evgeny_ermakov@mail.ru

Аннотация

Шизофрения связана с изменениями в иммунной системе и хроническим воспалением. В данной работе исследована способность антител больных шизофренией гидролизовать молекулы РНК, ДНК и гистонов, которые провоцируют воспалительные реакции. Показано, что IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют эти молекулы. Уровень гидролитических активностей IgG у больных оказался значительно выше, чем у здоровых доноров. Данные о каталитической активности антител могут отражать степень иммунных нарушений при шизофрении.

Считается, что патогенез шизофрении связан с патологией иммунной системы и хроническим воспалением. Хроническое воспаление может изменять нейрональную активность и приводить к характерной психотической симптоматике. Воспаление может запускаться при высвобождении различных молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (от англ. Damage-associated molecular patterns, DAMPs), таких как нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), гистоны и другие молекулы. Одним из важных признаков воспаления и нарушения гуморального иммунитета является образование каталитических антител (абзимов). Уровень каталитической активности абзимов отражает степень патологии гуморальной иммунной системы и может быть использован как потенциальный биомаркер.

В данной работе мы исследовали гидролитические активности иммуноглобулинов больных шизофренией, в частности, способность гидролизовать нуклеиновые кислоты и гистоны. Препараты IgG были получены из сыворотки крови 45 больных шизофренией и 32 здоровых доноров методом аффинной хроматографии. Отсутствие примесей в препаратах IgG доказано с помощью SDS-PAGE и MALDI-TOF MS. Анализ гидролитических активностей IgG проводили с помощью электрофореза после инкубации IgG с субстратами. В результате показано, что препараты IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), так и гистоны (H1, H2a, H2b, H3 и H4). ДНК-гидролизующая активность обнаружена у 80 % препаратов IgG пациентов, а РНКазная — у 100 % препаратов. Анализ продуктов гидролиза показал, что антитела действуют как на экзонуклеазы, так и на эндонуклеазы. ДНК- и РНК-гидролизирующие активности IgG пациентов оказались в 4–8 раз выше ($p < 0,01$), чем у IgG здоровых доноров. Аналогично, уровень гистон-гидролизирующей активности IgG был в 6–20,1 раз ниже (в зависимости от гистона) в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$). При этом антитела не гидролизовали другие протестированные белки.

Таким образом, при шизофрении образуются каталитические антитела, гидролизующие различные молекулы, относящиеся к DAMPs. Образование каталитических антител является признаком нарушений в иммунной системе больных и может быть следствием увеличения концентрации DAMPs в кровотоке. Поэтому данные о каталитической активности IgG при шизофрении могут быть перспективными биомаркерами иммунных нарушений.

© Е. А. Ермаков, Г. А. Невинский, В. Н. Бунева, 2021

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 20-015-00156, проекта ПФНИ РФ (2021–2030) 0245-2021-0009 № 121031300041-4, а также Стипендии Президента РФ № СП-2258.2019.4.

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН ЗА 2019–2020 ГОДЫ

П. В. Казимиров

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань

E-mail: kazimirovpavel1994@gmail.com

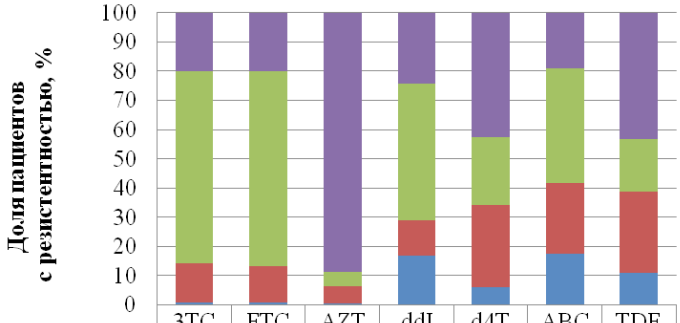
Аннотация

Генотипический анализ участка гена pol ВИЧ-1, кодирующего протеазу и значительный участок обратной транскриптазы позволяет установить взаимосвязь между мутациями ВИЧ в организме пациента и возникновением резистентности к антиретровирусным препаратам, а также скорректировать схему лечения пациентов.

Антиретровирусные препараты используются для снижения уровня вирусной нагрузки ВИЧ-1 и увеличения комфорта жизни пациентов, а также их продолжительности жизни. Однако недостаточная приверженность терапии и высокая частота ошибок в ходе обратной транскрипции вируса ВИЧ приводят к тому, что в организме пациента могут возникнуть и со временем начать преобладать варианты ВИЧ, устойчивые к препаратам, которые назначают пациенту [1, 3]. В рамках антиретровирусной терапии (АРВТ) используются препараты нескольких групп: нуклеозидные ингибиторы обратной транскрипции (НИОТ), ненуклеозидные ингибиторы обратной транскрипции (ННИОТ), ингибиторы протеазы (ИП), ингибиторы интегразы (ИИ), а также ингибиторы слияния и антагонисты CCR-5 рецепторов [1, 2]. В настоящее время на территории РФ зарегистрированы и используются для исследования резистентности три тест-системы для генотипирования ВИЧ-1: ViroSeq HIV-1 Genotyping System (Abbott, США); «АмплиСенс-HIV-Resist-Seq» (ЦНИИ эпидемиологии, РФ); и TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit (Siemens Healthcare, Германия). При этом тест-системы Abbott и Siemens позволяют определять устойчивость к НИОТ, ННИОТ и ИП, а тест-система от ЦНИИ эпидемиологии позволяет дополнительно определять устойчивость к ИИ и антагонистам CCR-5 рецепторов [1, 2].

В рамках исследования ВИЧ-1 на резистентность к АРВТ на базе ГАУЗ «РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ» в период 2019–2020 гг. было исследовано 219 образцов пациентов. Исследования проводились на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США) с использованием тест-системы ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2 (Abbott, США). Результаты исследований обрабатывались с помощью ПО Sequencing Analysis Software 5.3 (Applied Biosystems, США) и Viroseq v.3 (Celera, США). Затем последовательности нуклеотидов в формате fasta загружались в базу данных Stanford HIVdb и подвергались дополнительному анализу.

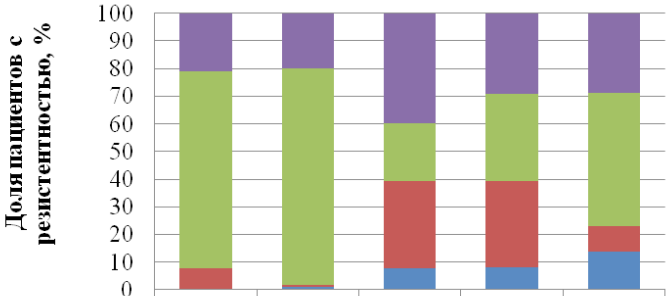
Полученные данные о степени резистентности для всех образцов были собраны в базу данных с использованием ПО Microsoft Excel, после чего была проанализирована частота возникновения и степень резистентности к лекарственным препаратам. Визуализация результатов проводилась с использованием гистограммы с накоплением, при этом использовались международные сокращения для лекарственных препаратов (рис. 1–3).



	3TC	FTC	AZT	ddI	d4T	ABC	TDF
Не резистентен (%)	20,09	20,09	88,58	24,20	42,47	19,18	43,38
Высокорезистентен (%)	65,75	66,67	5,02	47,03	23,29	39,27	17,81
Среднерезистентен (%)	13,24	12,33	5,94	11,87	28,31	24,20	27,85
Малорезистентен (%)	0,91	0,91	0,46	16,89	5,94	17,35	10,96

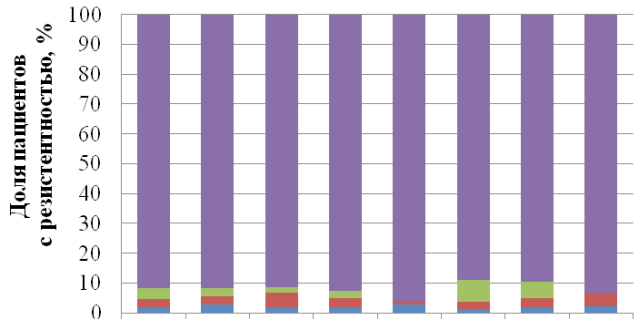
Рис. 1. Распределение уровней чувствительности к препаратам группы НИОТ

© П. В. Казимиров, 2021



	EFV	NVP	ETR	DOR	RPV
Не резистентен (%)	21,00	20,09	39,73	29,22	28,77
Высокорезистентен (%)	71,23	78,08	21,00	31,51	48,40
Среднерезистентен (%)	7,31	0,91	31,51	31,05	9,13
Малорезистентен (%)	0,46	0,91	7,76	8,22	13,70

Рис. 2. Распределение уровней чувствительности к препаратам группы ННИОТ



	FPV	IDV	SQV	LPV	DRV	NFV	ATV	TPV
Не резистентен (%)	91,78	91,78	91,32	92,69	96,35	89,04	89,50	93,61
Высокорезистентен (%)	3,65	2,74	1,83	2,28	0,00	7,31	5,48	0,00
Среднерезистентен (%)	2,74	2,74	5,02	3,20	0,91	2,28	3,20	4,11
Малорезистентен (%)	1,83	2,74	1,83	1,83	2,74	1,37	1,83	2,28

Рис. 3. Распределение уровней чувствительности к препаратам группы ИП

Полученные в ходе исследования результаты позволяют говорить о том, что чаще всего у пациентов с ВИЧ-1, которые проживают в республике Татарстан, наблюдается высокая резистентность к ламивудину (3TC), эмтрицитабину (FTC) и диданозину (ddI) из группы НИОТ, а также к таким препаратам, как эфавиренц (EFV), невирапин (NVP) и рилпивирин (RPV) из группы ННИОТ. В то же время наименее часто резистентность возникала к препаратам из группы ингибиторов протеазы, а также зидовудину (AZT) из группы НИОТ. Большинство остальных препаратов также показывали высокую частоту возникновения резистентности в целом, однако процент случаев с высокой устойчивостью к лекарственной терапии все же был ниже. Кроме того, полученные результаты также могут помочь в прогнозировании эффективных схем лечения пациентов.

Литература

1. Бобкова М. Р., Грезина Л. А. и др. Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ. Федеральные клинические рекомендации // Лабораторная служба. 2017. Т. 6.

2. Лободанов С. А. Тесты для выявления лекарственной устойчивости ВИЧ: настоящее и будущее. // ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ И ИММУНОСУПРЕССИИ. 2015. Т. 7, № 2.

3. Clutter D. S., Jordan M. R., Bertagnolio S., Shafer R. W. HIV-1 Drug Resistance and Resistance Testing. // Infect. Genet. Evol. 2016. Vol. 46. P. 292–307.

МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ*

М. И. Кобякова[1], Д. Ю. Штатнова[1,2], Я. В. Ломовская[1], А. И. Ломовский[1], Р. С. Фадеев[1,2]

[1] *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*
[2] *Пущинский государственный естественно-научный институт*

E-mail: ritaaaaa49@gmail.com

Аннотация

Активация транскрипционного фактора NF-kB с последующей транскрипционной регуляцией экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Mcl-1 и XIAP может опосредовать устойчивость к ДНК-тропным препаратам у клеток острого миелоидного лейкоза линии THP-1 в многоклеточных агрегатах.

Раннее в наших работах было показано, что в трехмерных многоклеточных агрегатах клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) формируется устойчивость к противоопухолевым препаратам. В данной работе обсуждаются некоторые механизмы, которые могут лежать в основе данного феномена.

При исследовании проникновения низкомолекулярных веществ (~1 кДа) с помощью флуоресцентного зонда Calcein-AM было показано, что данный зонд накапливается одинаково во всех клетках многоклеточного агрегата. Полученные данные указывают на то, что в трехмерных многоклеточных агрегатах лейкозных клеток линии THP-1 не происходит снижения проникновения низкомолекулярных веществ. Изучение пролиферативной активности клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах (анализ распределения по фазам клеточного цикла, митотической активности и экспрессии ядерного антигена Ki-67) показало, что в них не происходит снижения пролиферативной активности. Анализ экспрессии основных белков множественной лекарственной устойчивости, таких как P-гликопротеид, MRP1 и BCRP, у клеток ОМЛ показал, что отсутствует конститутивная экспрессия всех трех исследованных белков семейства ABC переносчиков. Полученные результаты указывают на то, что в многоклеточных агрегатах клетки остаются пролиферирующими и повышение лекарственной устойчивости не связано с изменением транспорта веществ и экспрессией основных белков МЛУ. Далее, для клеток ОМЛ в трехмерных многоклеточных агрегатах было показано повышение уровня фосфорилированного RelA (p65), основного маркера активации NF-kB, а также повышение экспрессии антиапоптотических белков Mcl-1, Bcl-2 и XIAP.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что механизм повышения устойчивости к действию ДНК-повреждающих препаратов у клеток ОМЛ в многоклеточных агрегатах может быть связан с активацией транскрипционного фактора NF-kB с последующей транскрипционной регуляцией экспрессии антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Mcl-1 и XIAP.

© М. И. Кобякова, Д. Ю. Штатнова, Я. В. Ломовская, А. И. Ломовский, Р. С. Фадеев, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90062.

ИНГИБИРОВАНИЕ p53 ЧЕРЕЗ CDK8/19 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ИОНИЗИРУЮЩЕМУ ИЗЛУЧЕНИЮ*

О. А. Кучур[1], А. А. Штиль[2]

[1] *Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва*

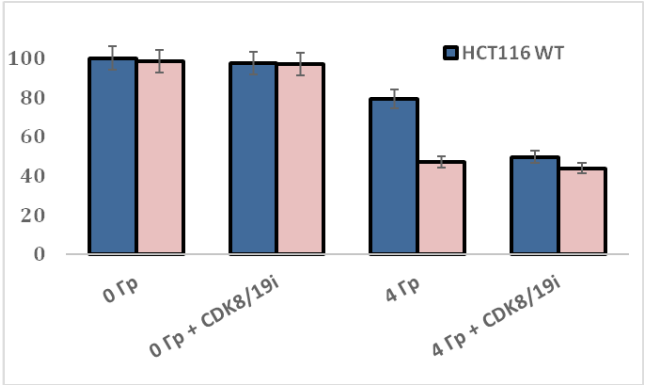
E-mail: kuchur@scamt-itmo.ru

Аннотация

Ответ опухолевых клеток на терапевтическое ионизирующее излучение включает ряд процессов, в которых значительную роль играет белок p53. Чтобы изучить возможность радиосенсибилизации опухолевых клеток путем воздействия на механизмы, зависимые от p53, мы исследовали роль транскрипционных протеинкиназ CDK8/19 в балансе гибели и выживаемости опухолевых клеток при действии гамма-излучения.

Мы продемонстрировали, что клетки колоректальной карциномы человека HCT116 (p53 дикого типа) претерпевают зависимую от времени (1–5 дней) и дозы (0–6 Гр) остановку в фазе G2/M при однократном λ-облучении. Фактически не было зарегистрировано событий SubG1 (апоптоза). Напротив, облучение изогенной сублинии HCT116p53KO с нефункционирующим p53 было летальным. Эти эффекты наблюдались в массовой культуре клеток, а также при клоногенном анализе. Облучение клеток HCT116 вызвало индукцию и экспрессию p53, p21, а также проапоптотических PUMA и NOXA, тогда как ни один из этих маркеров не регулировался в нокаутной линии HCT116p53KO. Эти результаты предполагают участие p53-опосредованных процессов, особенно p53- / p21-зависимой остановки клеточного цикла, в избегании опухолевыми клетками гибели, индуцированной радиацией. Чтобы предотвратить активацию передачи сигналов p53, клетки HCT116 облучали в присутствии селективных ингибиторов CDK8/19 (CDK8/19i). Сам по себе ингибитор не обладал токсичностью и не влиял на выживаемость клеток в течение 14 дней. Однако в сочетании с 4 Гр ингибитор CDK8/19 эффективно предотвращал накопление клеток на границе контрольной точки G2/M и значительно увеличивал процент апоптотической фракции клеток. Эти события сопровождались ослаблением экспрессии мРНК и белков p53 и p21. В сублинии HCT116p53KO соединение CDK8/19i не влияло на эффекты облучения.

Наши результаты показывают, что ингибирование CDK8/19 в облученных клетках p53 дикого типа функционально сходно с нокаутом p53: фармакологическое ослабление ответов p53 (клетки HCT116) или генетическая инактивация p53 (клетки HCT116p53KO) снимают контрольную точку G2 M и препятствуют восстановлению радиационно-индуцированного повреждения. Таким образом, ингибирование репрограммирования транскрипции, опосредованного CDK8/19, становится терапевтически привлекательным подходом к радиосенсибилизации опухолей.



Выживаемость клеток (%) HCT116 через 3 дня после воздействия гамма-излучения в комбинации с ингибитором CDK8/19

© О. А. Кучур, А. А. Штиль, 2021

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-34-90046.

CNV АНАЛИЗ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКИХ ЭКЗОМОВ ПАЦИЕНТОВ С НЕКОРОНАРОГЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СЕРДЦА

О. Д. Левданский, Р. С. Шулинский, Е. А. Мишук, Л. Н. Сивицкая

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

E-mail: o.liaudanski@igc.by

Аннотация

Проведен анализ ассоциаций CNV из данных высокопроизводительного секвенирования с некоронарогенными заболеваниями сердца клинических экзомов 30 пациентов. Выявлены ассоциации 16 CNV-локусов 14 генов с развитием патологии данного типа.

Некоронарогенные заболевания сердца представляют собой группу различных по этиологии и патогенезу заболеваний миокарда воспалительного, дистрофического или дегенеративного характера. Вариативность в этиологии и патогенезе зачастую значительно осложняют диагностику данного типа патологии, даже с применением высокопроизводительного секвенирования (NGS). В зависимости от применяемой панели генов, при проведении NGS выявление патогенной мутации (SNP) удается всего в 30–40 % случаев. С целью повышения точности диагностики и поиска новых возможных генетических маркеров предрасположенности была отработана методика поиска CNV в данных NGS последовательностей клинических экзомов пациентов с кардиомиопатиями, а также анализ их распределения среди пациентов и индивидов без кардиопатологии.

Пробоподготовка образцов проводилась с использованием наборов реагентов Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep and Enrichment Reagents, TruSight One Expanded — Enrichment Oligos и IDT® for Illumina® Nextera™ DNA UD Indexes Set A (Illumina). Высокопроизводительное секвенирование осуществлялось на приборе NextSeq 550 с помощью NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 циклов). Панель Trusight ONE Expanded включает в себя около 6 700 генов, для которых показана связь с какими-либо наследственными заболеваниями. Выборка включала 96 образцов, из которых 30 имели некоронарогенную патологию сердца. Картирование прочтений осуществлялось с помощью bwa, вызов CNV проводился с использованием ClinCNV. Для поиска ассоциаций патологии с отфильтрованными CNV применялся пакет R CNVRanger, для подготовки и форматирования данных в Python — библиотеки numpy и pandas. Тестирование ложноположительных результатов проводилось с помощью FDR.

В результате анализа были выявлены ассоциации ($p < 0,05$) с некоронарогенной патологией сердца для 16 CNV-локусов в 14 генах: AADAC, ANKRD11, ATAD3A, CCDC114, COL7A1, COL8A2, DUSP22, FASN, HLA-A, HOXA1, KIR2DL3, SCARF2, TAS2R43, TYRO3. Из них 5 оказались делециями, остальные 11 — дупликациями. Наиболее сильную связь ($p \approx 0,0016$) продемонстрировала дупликация участка гена COL8A2, локализованного на 1-ой хромосоме и кодирующем альфа-2 цепь коллагена 8-го типа. Данный белок является основным компонентом базальной мембраны эндотелия роговицы, некоторые типы дистрофии которого ассоциированы с мутациями в этом гене.

В дальнейшем планируется расширение выборки пациентов, поиск ассоциаций с другими типами наследственных заболеваний, а также отработка других вариантов вызова CNV для его оптимизации.

© О. Д. Левданский, Р. С. Шулинский, Е. А. Мишук, Л. Н. Сивицкая, 2021

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК К562 В МИЕЛОИДНОМ НАПРАВЛЕНИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ФОРМИРОВАНИЕМ УСТОЙЧИВОСТИ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ*

Я. В. Ломовская[1], А. Д. Дергилева[2], М. И. Кобякова[1], А. И. Ломовский[1], Р. С. Фадеев[1]

[1] *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E-mail: yannalomovskaya@gmail.com

Аннотация

Изучение механизмов устойчивости лейкозных клеток к противоопухолевому иммунитету остается актуальной задачей. Нами было выявлено, что снижение экспрессии DR и DR5 и, соответственно, повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу у лейкозных клеток линии К562 может происходить на фоне направленной дифференцировки в мегакариоцитоподобном направлении.

Цитокин APO2L/TRAIL или TNFSF10 — белок семейства фактора некроза опухоли является одним из основных молекулярных эффекторов противоопухолевого иммунитета. Известно, что опухолевые клетки обладают повышенной чувствительностью к TRAIL по сравнению с нормальными клетками, главным образом из-за низкой экспрессии DcR1 и DcR2 (рецепторов-ловушек) и большей представленности DR4 и DR5 (проапоптотических TRAIL-рецепторов). Так как баланс про- и антиапототических рецепторов к TRAIL может играть ключевую роль в чувствительности клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу, изменение экспрессии TRAIL-рецепторов в процессе дифференцировки может определять чувствительность клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу. Ранее нами было показано, что снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL и, соответственно, повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу может происходить на фоне дифференцировки миелоидных клеток в моноцитарно-макрофагальном направлении как при направленной дифференцировке лейкозных клеток, так и при созревании моноцитов периферической крови в макрофаги. В этом исследовании мы обратили внимание на дифференцировку лейкозных клеток в мегакариоцитоподобном направлении. Данная работа направлена на изучение экспрессии рецепторов к TRAIL, и, следовательно, чувствительности к TRAIL-индуцированному апоптозу клеток ОМЛ при дифференцировке лейкозных клеток в мегакариоцитоподобном направлении.

В работе использовали клетки хронического миелоидного лейкоза К562, обработанные индуктором мегакариоцитоподобной дифференцировки — форболовым эфиром (PMA). Инкубация клеток осуществлялась с 10 нМ PMA в течение 96 часов (К562 PMA). Контролем мегакариоцитоподобной дифференцировки служила оценка экспрессии у клеток CD41 и CD61. Анализ экспрессии CD41, CD61, DR4 и DR5 осуществляли методом проточной цитометрии с помощью соответствующих моноклональных антител. Цитотоксическое действие izTRAIL оценивали по интенсивности восстановления клетками резазурина.

Анализ экспрессии CD41 и CD61 показал дифференцировку в мегакариоцитоподобном направлении клеток К562 PMA. Экспрессия CD41 была выявлена у (20 ± 1) %, а CD61 — у (86 ± 2) % популяции клеток К562 PMA. У контрольных клеток К562 экспрессии обоих маркеров обнаружено не было. Анализ экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5 показал, что самый высокий процент клеток, несущих данные рецепторы, наблюдался у контрольных клеток К562 — (95 ± 1) % и (87 ± 2) % соответственно. У клеток К562 PMA представленность DR4 в популяции снижалась до (40 ± 3) %, а DR5 — до (21 ± 1) % клеток. Полученные данные согласуются с анализом действия izTRAIL на исследуемые клетки. Было показано, что (55 ± 4) % клеток К562 было чувствительно к действию izTRAIL, и только (5 ± 1) % популяции клеток К562 PMA.

Таким образом, снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL и, соответственно, повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу может происходить на фоне направленной дифференцировки лейкозных клеток в мегакариоцитоподобном направлении.

© Я. В. Ломовская, А. Д. Дергилева, М. И. Кобякова, А. И. Ломовский, Р. С. Фадеев, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90061.

МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ ДЕЙСТВИЕ ABT-737 НА КЛЕТКИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА MV4-11 *

А. И. Ломовский, Ю. Л. Бабурина, Я. В. Ломовская, М. И. Кобякова, Р. С. Фадеев, О. В. Крестинина

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

E-mail: lomovskyalex@gmail.com

Аннотация

Одним из перспективных препаратов для применения в терапии острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) является мелатонин (МЕЛ) (N-ацетил-5-метокситриптамин) — гормон, секретируемый шишковидной железой. Нами было выявлено, что мелатонин способен снижать пролиферативную активность клеток MV4-11, а также вызывать падение мембранного потенциала митохондрий и повышать продукцию активных форм кислорода (АФК). Мелатонин может усиливать действие ABT-737, приводя к гибели клеток MV4-11.

Поиск и исследование механизмов действия новых препаратов для терапии острых миелоидных лейкозов является актуальной задачей. Одним из таких препаратов является мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) — гормон, секретируемый шишковидной железой. Известно, что помимо биологических функций МЕЛ проявляет противоопухолевую активность при различных опухолевых заболеваниях. Ранее мы показали, что МЕЛ в концентрации 1 мМ снижает пролиферативную активность клеток ОМЛ линии HL-60 и THP-1. Также МЕЛ вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий и активацию продукции активных форм кислорода. МЕЛ способен усиливать действие таких препаратов, как ATRA, Цитарабин и ABT-737. В данной работе мы исследовали влияние мелатонина и его совместное воздействие с таргетным препаратом ABT-737 на клетки ОМЛ линии MV4-11.

Анализ жизнеспособности оценивали по интенсивности восстановления клеток резазурина и окрашиванием клеток трипановым синим. Анализ изменения мембранного потенциала митохондрий и продукции АФК проводился по интенсивности флуоресценции красителей $DiOC_6(3)$ и DCFDA.

Было выявлено, что инкубация клеток с МЕЛ в концентрации 1 мМ и сниженной концентрации ABT-737 (10 нМ) в течение 24 ч способствовала снижению прироста клеток на 35 и 5 % относительно контроля. Также действие данных веществ не приводило к гибели клеток. Однако совместное применение привело к снижению пролиферативной активности клеток на 50 %, при этом вызвало гибель 30 % клеток. Далее было обнаружено, что МЕЛ способствует снижению мембранного потенциала в 2 раза и приводит к повышению продукции АФК примерно в 4 раза. ABT-737 не оказывал влияния на мембранный потенциал митохондрий и продукцию АФК. При совместном действии МЕЛ и ABT-737 результаты мембранного потенциала и продукции АФК были схожи с действием одного МЕЛ.

Таким образом, МЕЛ оказывает антипролиферативное действие на клетки ОМЛ MV4-11. Также МЕЛ вызывает нарушение функционирования митохондрий, приводя к снижению мембранного потенциала и активации продукции АФК, что может вызвать окислительный стресс. МЕЛ может усиливать действие ABT-737, вызывая гибель клеток. Однако механизм действия МЕЛ необходимо подробно изучить.

© А. И. Ломовский, Ю. Л. Бабурина, Я. В. Ломовская, М. И. Кобякова, Р. С. Фадеев, О. В. Крестинина, 2021

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90014.

РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS ПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* В УСЛОВИЯХ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК*

А. С. Майкова, Н. В. Березенкова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

E-mail: ann-maikova@yandex.ru

Аннотация

Энтеропатогенная бактерия *Clostridioides difficile* обладает сложноорганизованной системой CRISPR-Cas. Такая система должна координированно регулироваться бактериальной клеткой в ответ на различные сигналы изменения внешней среды и внутреннего физиологического состояния бактерии. В данной работе показана регуляция функционирования системы CRISPR-Cas *C. difficile* при воздействии на нее факторов образования биопленок.

Clostridioides difficile — грамположительная, анаэробная, спорообразующая бактерия, которая во всем мире является одним из основных возбудителей внутрибольничных кишечных инфекций, связанных с применением антибиотиков. *C. difficile* вызывает у пациентов диарею и псевдомембранозный колит — опасное заболевание кишечника, которое может привести к летальному исходу. В последнее время число серьезных случаев заболевания, вызванных *C. difficile*, значительно возросло в связи с появлением гипервирулентных штаммов и штаммов, устойчивых к действию антибиотиков. При этом многие аспекты патогенеза *C. difficile* до сих пор остаются малоизученными. Недавно у *C. difficile* было обнаружено присутствие активной системы CRISPR-Cas, обеспечивающей противофаговую защиту данной бактерии. *C. difficile* обладает довольно нестандартной CRISPR-Cas системой, которая состоит из множественных активно экспрессирующихся CRISPR-кассет (12 в референсном штамме 630) и нескольких наборов cas генов подтипа I-B (2 в штамме 630). Такое сложное строение данной системы у *C. difficile* ставит вопрос о ее роли в физиологии данного микроорганизма. Кроме того, присутствие активных CRISPR-Cas систем у патогенных бактерий рассматривается как возможность создания новых антимикробных препаратов на основе механизма их действия. Изучение закономерностей функционирования и регуляции CRISPR-Cas систем необходимо для успешной разработки такого типа лекарств. Целью данной работы является изучение регуляции системы CRISPR-Cas *C. difficile* в условиях образования биопленок.

Эксперименты по анализу экспрессии компонентов системы CRISPR-Cas при помощи метода количественной ПЦР CRISPR-Cas в биопленочных и планктонных клетках *C. difficile* выявили индукцию экспрессии всех CRISPR-кассет и cas-оперонов в биопленках. Последующий анализ эффективности коньюгации плазмид показал повышение уровней интерференции в биопленках по сравнению с планктонными культурами в случае практически всех CRISPR-кассет. Также в ходе выполнения экспериментов была показана индукция экспрессии cas-оперонов и всех CRISPR-кассет и увеличение уровней интерференции у части CRISPR-кассет при высоких внутриклеточных уровнях циклического ди-гуанозинмонофосфата, являющегося важным фактором образования биопленок у бактерий. Дополнительно в работе было выявлено, что в присутствии дезоксихолата натрия, который является фактором образования биопленок у *C. difficile*, в питательной среде происходит увеличение уровней экспрессии одного cas-оперона и части CRISPR-кассет и снижение эффективности интерференции в большинстве CRISPR-кассет.

Полученные результаты демонстрируют регуляцию системы CRISPR-Cas *C. difficile* в условиях образования биопленок.

© А. С. Майкова, Н. В. Березенкова, 2021

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00052).

БЫСТРОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ МЕТОДОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ И ДНК-НАНОМАШИН

Ю. И. Мальцева[1], Д. А. Горбенко[1], М. С. Рубель[1], Л. А. Шкоденко[1], Д. М. Колпащиков[1–3]

[1] Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург
[2] Университет центральной Флориды, Орландо, США
[3] Школа биомедицинских наук Бернетта Университета центральной Флориды, Орландо, США

E-mail: y_maltseva@scamt-itmo.ru

Аннотация

Был разработан метод детекции двуцепочечных фрагментов ДНК на основе изотермической амплификации SPA и ДНК-наномашин с отношением сигнал/фон 7,6 ± 0,7 без потребности в нагревании для расплетения вторичных структур.

В данной работе предложено использование ДНК-наномашины, состоящей из трех олигонуклеотидных последовательностей (см. таблицу). Два фрагмента последовательности T2 отвечают за расплетение дцДНК. Расплетение мишени облегчает доступ для селективного связывания с двумя фрагментами последовательностей T1 и F7. Это создает пространство для формирования структуры симметрично разделенного G-квадруплекса (G4). Она собирается при полной комплементарности всех частей и возможна только при появлении аналита. G4 способен связывать гемин и катализировать окисление субстрата с изменением цвета.

Бактериальную ДНК культуры *Escherichia coli* Nissle 1917 экстрагировали с помощью фенол-хлороформного метода. Для накопления целевой последовательности гена *E. coli* malB проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и две изотермические амплификации: петлевую изотермическую амплификацию (loop-mediated isothermal amplification — LAMP) и изотермическую амплификацию с помощью стеблепетлевого праймера (stem-loop-primer assisted isothermal amplification — SPA). Реакция осуществлялась с рекомендациями разработчиков методов: LAMP — 65 °C, 8 мМ $MgSO_4$, 60 мин; SPA — 65 °C, 8 мМ $MgSO_4$, 60 мин; ПЦР — температура отжига праймеров 64 °C, 40 циклов. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Смесь 1 мкЛ аналита и 1 мкМ сенсоров инкубировали в буфере в течение 5 минут либо при комнатной температуре (23–25 °C), либо при 95 °C с последующим охлаждением до комнатной температуры. Далее в смесь добавляли 1 мкМ гемина, 1 мМ диаминобензидина и 1 мМ перекоксида водорода и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут с последующим визуальным анализом и измерением оптической плотности (λ = 500 нм) на спектрофотометре NP50 (Implen, Германия).

Последовательности целевой ДНК, частей ДНК-наномашины и праймеров

Целевая ДНК	ATAGTCAGCCCATCATGAATGTTGCTGTCGATGACAGGTTGTTACAAAGGGAGAAGGG CA*TGGCGAGCGTACAGCTGCAAAATGTAACG*AAAGCCTGGGGCGAGGTCGTGGTATCGA AAGATATCAATCTCGATATCCATGAAGGTGAATTCGTGGTGTTTGTCGGACC
Последовательности ДНК-наномашины	
T1	CATATAAGGAATAGCAGAAGGCGGCTAG/HEG/*CGTTACATTTTGCA*/HEG/GGGTAGGG
T2	GACCTCGCCCCAGGCTTT/HEG/CTAGCCGCCTTCTGCTATTCCTTATATG/HEG/TGCCCT TCTCCCTTTGTAA
F7	GGGTTGGG/HEG/*GCTGTACGCTCGCCA*acc
Праймеры для ПЦР	
P1	GCCATCTCCTGATGACGC
P2	ATTTACCGCAGCCAGACG
Праймеры для LAMP	
FIP	CTGGGGCGAGGTCGTCCTATTCCGACAAACACCACGAATT
BIP	CATTTTGCAGCTGTACGCTCGCAGCCCATCATGAATGTTGCT
F3	GCCATCTCCTGATGACGC
B3	ATTTACCGCAGCCAGACG
Праймеры для SPA	
FrS	TTTATATAATATATAAAAGGTTGTTACAAAGG
BvS	TTTATATAATATATAAACGACCTCGCCC
Fr	AGGTTGTTACAAAGG
Bv	CGACCTCGCC

© Ю. И. Мальцева, Д. А. Горбенко, М. С. Рубель, Л. А. Шкоденко, Д. М. Колпащиков, 2021

В результате детекции продуктов амплификации ПЦР и LAMP с предварительной инкубацией при 95 °C был получен видимый сигнал. Анализ тех же образцов без нагрева не показал значимого отличия от фона. В результате детекции продуктов SPA сигнал был получен без предварительного нагрева с отношением сигнал/фон 7,6 ± 0,3. При этом отношение сигнал/фон было в 3,1 ± 0,2 раза больше, чем при детекции продуктов ПЦР и LAMP с нагревом.

Использование предложенной технологии может позволить осуществлять диагностику в условиях отсутствия специализированного оборудования и обученного персонала, а также повысить отношение сигнал/фон за счет отсутствия неспецифического накопления продукта амплификации SPA.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЫ *B. THURINGIENSIS* ИЗ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА*

Ю. А. Меркульева[1,2], А. А. Бондарь[3], И. С. Андреева[2], Д. Н. Щербаков[1,2]

[1] *Алтайский государственный университет, Барнаул*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

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

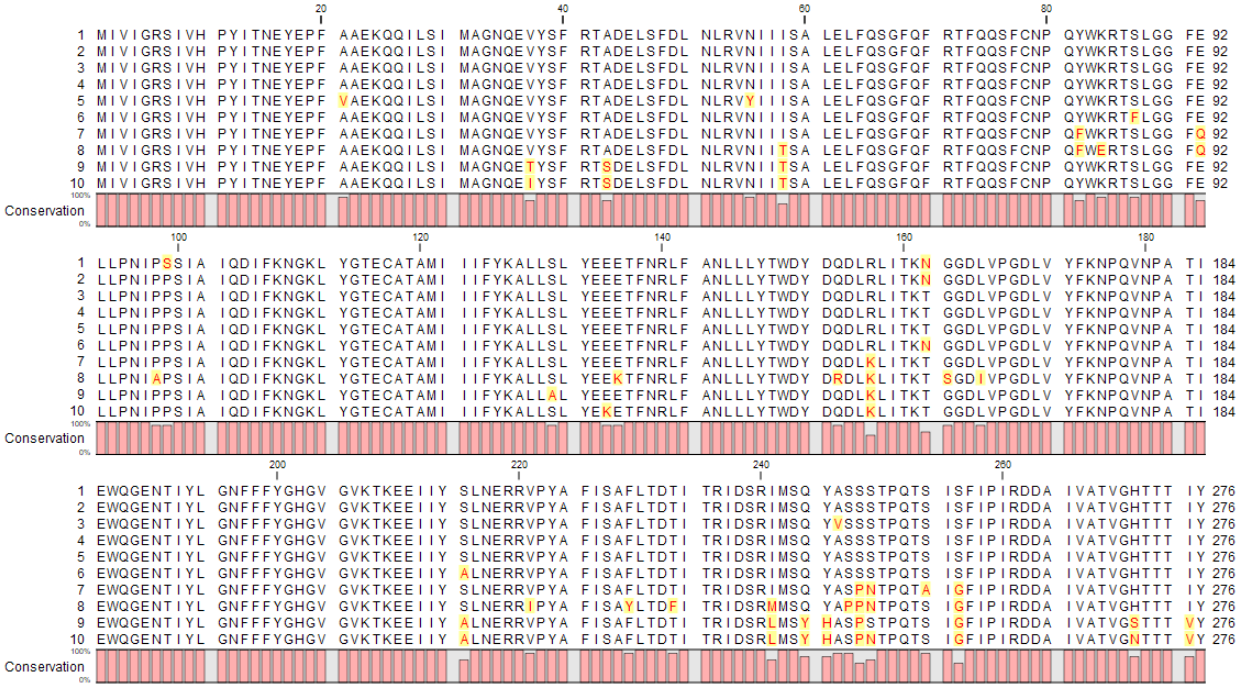
Аннотация

Трансглютаминазы — ферменты, катализирующие образование внутри- и межмолекулярных сшивок белков. Это свойство ферментов активно используется в пищевой промышленности, медицине и лабораторной практике. В работе проведен анализ генетического разнообразия трансглютаминаз из 51 изолята *B. thuringiensis* коллекции ГНЦ ВБ «Вектор» и обнаружено 10 вариантов фермента, отличающихся по первичной структуре белка.

Трансглутаминазы (Tgl, EC 2.3.2.13), катализируют образование ковалентных связей между свободными аминогруппами (или аминогруппами из боковых цепей лизина) и гамма-карбоксамидными группами глутамина, обеспечивая модификации белков посредством внутри- или межмолекулярного сшивания. Tgl широко присутствуют в тканях и жидкостях организма животных, растений, рыб и микроорганизмов [1, 2].

Среди бактерий Tgl-подобные белки обнаружены только у спорообразующих бактерий классов *Bacilli* и *Clostridia*, их функция заключается в формировании бактериальной споры. Tgl представляет собой небольшой однодоменный белок, продуцируемый в своей активной форме. Неизвестно ни одного фактора (Ca^{2+}, GTP или другого), контролирующего его активность [3]. Tgl микробного происхождения в промышленных масштабах используют для переработки молока, мяса, рыбы и других продуктов питания, а так же применяют в медицине и биотехнологических процессах, например, для ферментативного получения конъюгатов терапевтических средств [1, 4].

В данной работе нами были исследованы изоляты *B. thuringiensis,* в том числе бактерии, выделенные из долины гейзеров полуострова Камчатка.



Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей вариантов трансглютаминазы (CLUSTAL W)

© Ю. А. Меркульева, А. А. Бондарь, И. С. Андреева, Д. Н. Щербаков, 2021

* Исследование выполнено при поддержке Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, № FZMW-2020-0002.

Фрагменты гена *tgl*, кодирующего трансглютаминазу, длиной ~1050 п.н. амплифицировали в ПЦР с помощью праймеров TG-Btur_548F (5'-cctgtacaaggtcctgaagatatg-3') и TG-Btur_1605R (5'-gatctcattgcgaatgtgacca-3') и секвенировали по методу Сенгера. Все полученные нуклеотидные последовательности транслировали в аминокислотные последовательности с помощью пакета программ MEGA-X. Участок, кодирующий Tgl, был равен 276 а.о. во всех последовательностях.

Для оценки разнообразия Tgl по аминокислотному составу строили филогенетическую дендрограмму по методу ML. Последовательности разделились на 10 клад. При выравнивании аминокислотных последовательностей (см. рисунок) видно, что замены а. о. разбросаны по всей последовательности белка, что представляет интерес для дальнейшего изучения их влияния на ферментативные свойства Tgl.

На основе всех 10 полученных последовательностей были сконструированы векторы для продукции ферментов в близкородственной бактерии *B. subtilis* для дальнейшего изучения их технологических свойств.

Литература

1. Dunming Z., Qiaqing W., Ling H. Industrial Enzymesin Comprehensive Biotechnology // Pergamon. 2019. 3rd ed. P. 1–13.

2. Zilhão R., Isticato R., Martins L. O. et al. Assembly and function of a spore coat-associated transglutaminase of Bacillus subtilis // J. Bacteriol. 2005. Vol. 187, No. 22. P. 7753–7764.

3. Fernandes C. G., Plácido D., Lousa D. et al. Structural and Functional Characterization of an Ancient Bacterial Transglutaminase Sheds Light on the Minimal Requirements for Protein Cross-Linking // Biochemistry. 2015. Vol. 54, No. 37. P. 5723–5734.

4. Dennler P., Chiotellis A., Fische E. et al. Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody–Drug Conjugates //Bioconjugate Chem. 2014. Vol. 25, No. 3. P. 569–578.

STUDY OF T-CELL RECEPTORS ANTIGEN SPECIFICITY LANDSCAPE

R. V. Mungalov[1], M. A. Turchaninova[1,2], D. M. Chudakov[1–3]

[1] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[3] *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*

E-mail: Mungalov.roman@yandex.ru

Abstract

Nowadays, there is a lack of opportunities for diagnostic application of T-cell receptors (TCR) analysis. The problem is the paucity of our knowledge about TCR with known antigen specificity. In this study, we develop a new platform for effective anticipation of antigen-recognizing clusters of homologous variants of TCR and definition of TCR specificity, based on creation of a library of TCR degenerated by super specific CDR3 positions. This genetic engineered toolkit will help us to understand the patterns of TCR clustering against antigens with the same specificity and possible cross-reactivity.

Adaptive immunity of all vertebrates is a powerful tool for prevention and eliminating of diverse pathogens of all kinds, autoimmune imbalances and cancer danger. It consists of two main branches: B- and T-cell immunity. Each of them is crucial for the immune homeostasis and they are specialized in differ.

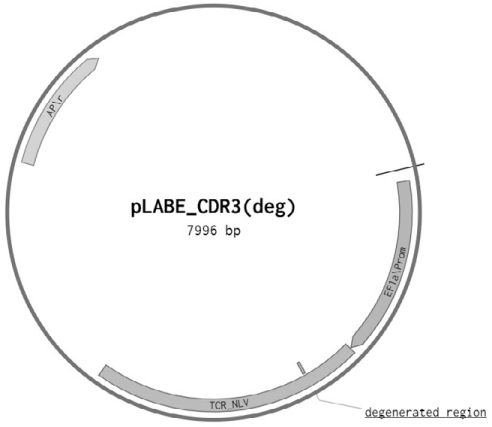


Fig. 1. Working plasmid

In this project, we focus on "T side" of our natural defense and zoom in a central part of T-cells, namely T-cell receptors. These molecular complexes on the surface of each T cell mediate immune synapse formation and realization of the immune response. In the research, we prepare a library of TCR each of them is degenerated by super specific CDR3 positions, which define uniqueness of an exact T-cell receptor. We designed a toolkit similar with the natural process of V(D)J recombination of gene segments in the genome of our adaptive immune cells followed by a formation of repertoire of colossal number of TCR variants (~10^9), but theoretically even more, which are specific for virtually any possible antigen in the world.

To reach this goal, we have constructed plasmid vectors (Fig. 1), one of which is a reference vector with the CMV (cytomegalovirus) T-cell receptor gene with a known annotated sequence. The second vector carries the same receptor gene but is artificially degenerated at certain CDR3 positions. Based on this degeneracy, a library of genetic vectors was obtained, which simulates repertoire diversity of TCR with the power of about 1,000 variants.

We also optimize the transfection protocol via Lonza using both primary PBMC and Jurkat cell line (Fig. 2). Eventually, we have reached about 50 % transfection efficacy. After the transfection procedure, cells were subjected to immunocytochemical staining with MHX-dextramers and anti-CD3/CD8 antibodies for positive control. To minimize the intrinsic receptors contribution, which express on the surface of T cells, we performed experiments on cells that are negative for the HLA-A*02:01 allele, ensuring that cross-reactivity of dextramers with the bodies of "native" receptors was excluded. Furthermore, the transgenic receptor is a chimeric protein with a constant region borrowed from the mouse. This modernization facilitates to minimize the probability of cross-assembly of the constant region with α and β-chains of the native receptors.

Recently, we have sorted CD4+ and CD8+ T-cell subpopulations (not just CD8+ as originally planned, as dextramers responded equally efficiently to both fractions) in several replicates in the number of ~2,000 positive cells and ~50,000 control (CD3-) cells (Fig. 3). Cells were transfected with only and further selected those presumably expressing the transgenic receptor. The reference vector with CMV receptor was not included in the experiment up to now due to the lack of dextramers.

In the nearest future we plan to assemble a cDNA library from sorted cells with further sequencing of degenerate T-cell receptor sites and comparative analysis of the repertoires of receptor variants recognizing and not recognizing the target antigen (MHC-dextramer) and identifying critical positions of recognition.

© R. V. Mungalov, M. A. Turchaninova, D. M. Chudakov, 2021

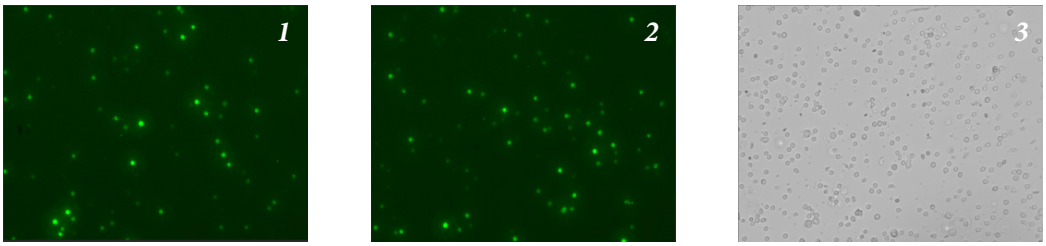


Fig. 2. Control plasmid *pmax*GFP transfection via Lonza 4D-Nucleofector. Efficiency ~40 %;
1, *2* — GFP-positive PBMC; *3* — background

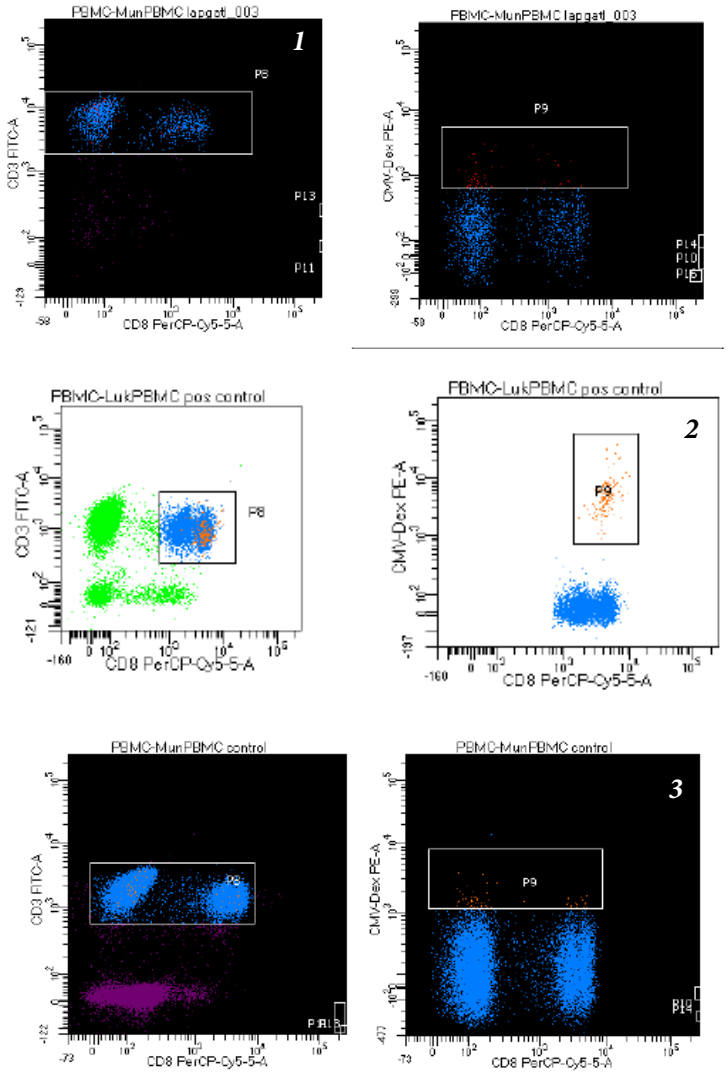


Fig. 3. PBMC staining by MHC Dextramer; *1* — experiment HLA- A*02:01- with pLABE_CDR3(deg) (CD3+(P8)/Dex+(P9)) ~3.9 %;
2 — positive control HLA-A*02:01+ without pLABE_CDR3(deg) (CD3+(P8)/Dex+(P9)) ~4 %;
3 — negative control HLA-A*02:01- without pLABE_CDR3(deg) (CD3+(P8)/Dex+(P9)) ~0,5%

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ АМФК НА ОСНОВЕ FRET-БИОСЕНСОРА *

Д. С. Новикова, А. А. Пожарский

Санкт-Петербургский государственный технологический институт

E-mail: dc.novikova@gmail.com

Аннотация

АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК) играет важную роль в поддержании энергетического баланса организма. Создание клеточных моделей, позволяющих проводить оценку активности фермента, является важной задачей при разработке агентов, стимулирующих активность АМФК.

АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК) является ключевым регулятором энергетического баланса как на клеточном уровне, так и на уровне организма в целом. Нарушение нормального функционирования фермента приводит к развитию системных нарушений углеводного, липидного, белкового метаболизма. Существенное снижение активности АМФК наблюдается при ожирении, диабете, метаболическом синдроме, некоторых типах раковых заболеваний. Таким образом, поиск и разработка агентов, повышающих активность рассматриваемой киназы, является перспективным направлением для терапии заболеваний, ассоциированных с метаболическими расстройствами.

Один из наиболее распространенных методов определения активности АМФК — оценка степени фосфорилирования по основному активационному сайту киназы, консервативному остатку треонина (Thr-172), с использованием антител. Данный метод позволяет провести быструю оценку активности АМФК, но это косвенный метод, так как подобная модификация не является абсолютно необходимой для проявления активности АМФК. Было показано, что активация киназы возможна даже при отсутствии фосфорилирования по остатку треонина за счет связывания АМФ или взаимодействия с активаторами, аффинными к альтернативному аллостерическому сайту.

Для измерения непосредственно киназной активности АМФК было предложено использовать FRET-биосенсор. Основное преимущество такого биосенсора — возможность динамического мониторинга киназной активности в живых клетках. Первым разработанным FRET-биосенсором активности АМФК стал AMPKAR (AMPK Activity Reporter). Основой для этого биосенсора стала репортерная система для PKA киназы, модифицированная по субстратному мотиву таким образом, чтобы он оказался специфичным для АМФК. Ранее нами были получены клеточные модели на основе AMPKAR, однако основным недостатком таких моделей, несмотря на высокую чувствительность, является маленький динамический диапазон.

Последующая оптимизация AMPKAR-системы, заключавшаяся в замене флуоресцентных белков на модифицированные белки с повышенной светимостью и внедрении органелл-специфичных последовательностей, привела к разработке целой серии репортерных систем ABKAR. Для получения более чувствительной и эффективной клеточной модели, были использованы две репортерные системы: ABKAR и ABKAR(T/A) с заменой целевого остатка Thr на Ala в субстратном домене.

Для получения клеточных моделей на основе выбранных репортерных систем плазмиды pcDNA3-ABKAR (Addgene plasmid #140051) и pcDNA3-ABKAR(T/A) (Addgene plasmid #140052) с геном устойчивости к ампициллину нарабатывали в электрокомпетентных клетках *E. Coli* (штамм DH5alpha). Выделение ДНК проводили с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Для трансфекции в клетки H1299 дикого типа использовали FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). Селекцию трансфецированных клеток проводили на генетицине (G418).

При сравнении параметров полученной клеточной модели с моделью, созданной на основе AMPKAR, было показано, что замена флуоресцентных белков на более эффективные увеличила динамический диапазон системы почти на 60 %. Кроме того, применение клеточной модели на основе ABKAR(T/A) в качестве контроля позволяет исключить неспецифические реакции.

© Д. С. Новикова, А. А. Пожарский, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-73-00296.

СОЗДАНИЕ ТРАНСФЕЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С PGP-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ*

А. А. Пожарский, А. В. Сагайдак

НИЛ «Молекулярная фармакология»
Санкт-Петербургский государственный технологический институт

E-mail: a.a.pozharskiy@gmail.com

Аннотация

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к широкому кругу химиотерапевтических препаратов является одной из главных проблем при лечении онкологических заболеваний. Одна из причин развития МЛУ — гиперэкспрессия гена MDR1 и, следовательно, повышенная активность трансмембранного белка Pgp, обеспечивающего выброс лекарств из клетки. В НИЛ «Молекулярная фармакология» создана клеточная линия с Pgp-опосредованной химиорезистентностью для дальнейших исследований биологической активности веществ и самой природы химиорезистентности.

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) — отсутствие восприимчивости клеток к широкому ряду лекарственных препаратов, различающихся химическим строением и механизмом действия. Резистентные опухолевые клетки выживают при воздействии веществ в концентрациях, приводящих к гибели чувствительных клеток. Развитие МЛУ злокачественных опухолей является одной из ключевых проблем, значительно усложняющих процесс лечения онкологических заболеваний.

Важным фактором множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток является повышение уровня экспрессии гена MDR1, кодирующего трансмембранный белок семейства ABC — Р-гликопротеин (Pgp). В онкологических клетках Pgp обеспечивает усиленный выброс лекарственных препаратов, что обусловливает их устойчивость и жизнеспособность при лечении такими химиотерапевтическими агентами, как антрациклины, алкалоиды барвинка, таксаны, производные подофиллотоксина.

Для создания опухолевой клеточной линии с Pgp-опосредованной резистентностью на базе НИЛ «Молекулярная фармакология» была получена клеточная линия HCT116, трансфецированная с использованием плазмиды pHaMDRwt (Addgene plasmid #10957; http://n2t.net/addgene:10957; RRID:Addgene 10957). Для этого были подготовлены электрокомпетентные клетки *E. Coli* (штаммы Stbl3, DH5alpha); с их помощью осуществлена наработка плазмидной ДНК. Выделенную при помощи кита Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit ДНК использовали для трансфекции в клетки HCT116 дикого типа с использованием FuGENE® HD Transfection Reagent от Promega.

Селекцию трансфецированных клеток проводили с помощью противоопухолевого препарата Паклитаксел, который является субстратом Pgp.

Полученная клеточная модель будет использована для исследования биологической активности потенциальных противоопухолевых препаратов, а также механизмов развития клеточной химиорезистентности.

© А. А. Пожарский, А. В. Сагайдак, 2021

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-33-70250).

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ [C60] И [C70] НА СИНТЕЗ АФК В ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

Е. А. Савинова, Е. С. Ершова, Е. В. Проскурнина, С. В. Костюк

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

E-mail: savinova.ekaterina96@yandex.ru

Аннотация

Многие исследования подтверждают, что водные растворы производных фуллеренов обладают антиоксидантным эффектом в молекулярных моделях. В данной работе изучали образование внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) в культуре клеток фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ) под действием водорастворимых производных фуллеренов [C60] и [C70].

Уровень АФК в клетках после воздействия производных фуллеренов исследовали с помощью реагента H2DCFH-DA (2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат). После проникновения через плазматическую мембрану клетки реагент деацетилируется внутриклеточными эстеразами. Нефлуоресцирующий DCFH в цитоплазме окисляется свободными радикалами до интенсивно флуоресцирующего DCF. Детектировали уровень синтеза АФК в клетках на планшетном ридере на термостатируемой платформе (Enspire, Финляндия). Выбрали одинаковую нетоксичную концентрацию всех исследованных производных фуллеренов [C60] и [C70] — 0,4 мкМ. Ранее было показано, что эта концентрация не токсична для клеток. Для исследования были выбраны следующие производные фуллеренов: Ф17, имеющее основание C60, с присоединенными аминофенилбутиратами калия и Ф13 с основанием C70, модифицированное дифенилацетатом калия.

Исследуемые соединения культивировали с клетками ФЛЭЧ в CO_2-инкубаторе в течение 3 и 24 часов. В качестве контроля использовали клетки, культивирующиеся без воздействия фуллеренов, и среду без клеток (фоновый сигнал). После инкубации добавляли H2DCFH-DA и анализировали с использованием проточного цитофлуориметра.

Результаты свидетельствуют о различии воздействия на клетки производных фуллеренов [C60] и [C70]. При воздействии фуллеренов [C60] и [C70] в концентрации 0,4 мкМ на фибробласты уровень АФК снижается на протяжении 3 часов после инкубации, но спустя 24 часа эффекты разнятся. Производное фуллерена [C70] пролонгированно (в течение 24 часов) снижало уровень АФК в клетках, т. е. проявляло антиоксидантные свойства. При действии производного фуллерена с каркасом [C60] синтез АФК через 24 часа значительно возрастал, в 1,2–1,5 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о зависимости антиоксидантных свойств производных фуллеренов от химической структуры каркаса соединений. В дальнейшем это может иметь значение при разработке нанофармпрепаратов.

© Е. А. Савинова, Е. С. Ершова, Е. В. Проскурнина, С. В. Костюк, 2021

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

С. А. Саламайкина, О. П. Дрибноходова, Е. А. Дунаева,
А. С. Есьман, А. Ю. Бухарина, Г. В. Лешкина, К. О. Миронов

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Новосибирск

E-mail: salamaikina.sa@phystech.edu

Аннотация

Определение герминальных и соматических мутаций, связанных с развитием рака, широко используется для диагностики наследственных онкологических синдромов, определения предрасположенности к развитию злокачественных новообразований, подтверждения диагноза, ведения и мониторинга лечения, прогнозирования ответа на лечение и риска рецидива. Подход, основанный на пиросеквенировании, позволяет выявлять различные типы мутаций и при необходимости количественно определять соотношение мутантных и интактных аллелей.

Для выявления частых мутаций в генах *BRCA1/2* был разработан тест «BRCA-скрин» (форма комплектации набора «AmpliSens® Пироскрин»). Тест «BRCA-скрин» позволяет идентифицировать шесть распространенных мутаций: 5382insC (rs80357906), 4153delA (rs80357711), 300T>G (C61G, rs28897672), 2080delA (rs80357522) и 185delAG (rs80357914) в гене *BRCA1* и 6174delT (rs80359550) в гене *BRCA2*. Кроме того, метод пиросеквенирования помимо частых мутаций позволяет обнаруживать редкие замены в секвенированных фрагментах, например, rs80357783 и rs80357407.

Драйверные мутации в генах *BRAF*, *KRAS*, *HRAS* и *NRAS* связаны с различными видами рака и реакцией на лечение целевыми ингибиторами киназы. Высокая частота мутаций в гене *BRAF* при ряде онкологических заболеваний позволяет использовать соответствующие тесты для диагностики злокачественных новообразований. Разработана методика секвенирования 592–601 кодонов *BRAF*, позволяющая идентифицировать все мутации в этом локусе, включая наиболее частую мутацию p.V600E (c.1799T>A). Для идентификации мутаций в кодонах 592–601 разработан алгоритм, основанный на анализе отклонения значений сигналов в образцах потенциально содержащих и не содержащих мутации. Этот подход позволяет определить 2 % мутантного аллеля для V600R и V600K, 3 % для V600M и V600E и 10 % K601E. Разрабатываются подходы для повышения чувствительности анализа. Метод обнаружения мутаций в гене *KRAS* (PMID: 24340949) позволяет количественно оценить все возможные мутации в 12–13 кодонах с пределом обнаружения 3 %. В настоящее время разрабатываются аналогичные методы выявления мутаций для 12, 13 и 61 кодонов генов *HRAS* и *NRAS*.

Обнаружение соматических мутаций в генах *JAK2*, *MPL* и *CALR* используется в дифференциальной диагностике хронических миелопролиферативных новообразований, для мониторинга уровня клонального кроветворения и оценки эффективности терапии. Разработаны подходы для обнаружения мутации V617F в гене *JAK2* с помощью комбинации методов ПЦР и пиросеквенирования. Тест «ТРОМБО-скрин» («AmpliSens® Пироскрин») позволяет проводить количественный анализ (PMID: 25850251), аллель-специфичная ПЦР может повысить чувствительность до 0,25 % мутантной фракции (PMID: 30615403). Другие разработанные методы на основе пиросеквенирования позволяют выявлять активирующие мутации в 12 экзоне *JAK2* и идентифицировать наиболее распространенные мутации в 9 экзоне гена *CALR* и в 10 экзоне гена *MPL*.

В настоящее время в Центральном научно-исследовательском институте эпидемиологии разрабатываются или уже изготовлены наборы реагентов и наборов для определения герминальных и соматических мутаций, которые могут быть использованы для различных задач клинической и научной практики.

© С. А. Саламайкина, О. П. Дрибноходова, Е. А. Дунаева, А. С. Есьман, А. Ю. Бухарина, Г. В. Лешкина, К. О. Миронов, 2021

ВЛИЯНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВЕНЬ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

К. М. Фабушева, Ю. В. Дворник

ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», Гомель

E-mail: expmodels@irb.basnet.by

Аннотация

Оценено радиозащитное действие повышенного потребления никотиновой кислоты мышами линии C_{57}Bl/6 в течение 7 суток перед однократным общим облучением в дозе 3 Гр. Отмечено влияние приема никотиновой кислоты на уровень повреждения ДНК клеток костного мозга мышей через 1 час после облучения.

Введение

Никотиновая кислота (Na) и ее амид, никотинамид, являются наиболее распространенными формами витамина B3, также известного как ниацин. Никотиновая кислота биотрансформируется в простетическую группу ферментов, являющихся переносчиками водорода (НАД), а также потребляется ферментами репарации ДНК [1].

Показано, что ткани с высокой пролиферативной активностью, такие как кожа, требуют более высоких доз NAD+ для противодействия геномным нарушениям после воздействия УФ-излучения [2].

Ионизирующее излучение влияет на целостность структуры ДНК как при прямом действии, так и опосредованно, при образовании свободных радикалов. При этом среди прочих нарушений образуются одно- и двунитевые разрывы ДНК, которые могут быть выявлены методом ДНК-комет.

Цель работы

Целью работы было изучение влияния повышенного уровня потребления никотиновой кислоты на образование повреждений ДНК в клетках костного мозга мышей линии C_{57}Bl/6 после воздействия рентгеновского излучения.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на лабораторных мышах линии C57Bl/6 самцах в возрасте 2,5–3 месяца. Животных содержали в условиях стационарного вивария государственного научного учреждения «Институт радиобиологии НАН Беларуси» на полноценном стандартном пищевом рационе и свободным доступом к воде, 12/12-часовом режиме освещения и темноты, согласно установленным нормам.

Были выделены следующие экспериментальные группы животных: 1 — контроль (интактные животные); 2 — однократное общее облучение в дозе 3 Гр; 3 — никотиновая кислота (в течение недели в дозе 300 мг/кг путем контролируемого скармливания) + однократное общее облучение в дозе 3 Гр.

Мышей подвергали облучению с помощью рентгеновского аппарата биологического назначения X-Rad 320 Precision X-ray Inc (напряжение на трубке 320 кВ, мощность дозы 98,8 сГр/мин, фильтр № 2 (1,5 мм Al, 0,25 мм Cu, 0,75 мм Sn) расстояние до объекта 50 см).

Через час после облучения животных выводили из эксперимента и отбирали клетки костного мозга. Был проведен анализ поврежденности ДНК методом щелочного гель-электрофореза (метод ДНК-комет). Полученные изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CometScore. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет.

Результаты и обсуждение

Процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет в контрольной группе составило (4,64 ± 2,29) %. В группе животных, которая была облучена в дозе 3 Гр, наблюдалось увеличение данного показателя в 5,66 раз — (26,29 ± 4,29) %, $p < 0,01$.

Уровень повреждения ДНК клеток костного мозга в экспериментальной группе, которая в течение недели до облучения получала внутрижелудочно никотиновую кислоту, составил (22,28 ± 3,94) %, $p < 0,01$.

Отмечено незначительное протекторное действие предварительного приема никотиновой кислоты на уровень повреждения ДНК в клетках костного мозга мышей после рентгеновского облучения в дозе 3 Гр. Предпо-

© К. М. Фабушева, Ю. В. Дворник, 2021

ложительно, это обусловливается недостаточным временем после облучения, необходимым для подтверждения влияния никотиновой кислоты на систему репарации ДНК.

Литература

1. Doroftei B., Ilie O. D., Cojocariu R. O. et al. Minireview Exploring the Biological Cycle of Vitamin B3 and Its Influence on Oxidative Stress: Further Molecular and Clinical Aspects // Molecules. 2020. Vol. 25, No. 15. P. 3323.

2. Fania L., Mazzanti C., Campione E. et al. Role of Nicotinamide in Genomic Stability and Skin Cancer Chemoprevention // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 20, No. 23. P. 5946.

ПРЕОДОЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЗА СЧЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕДИ АНТИОКСИДАНТАМИ

С. А. Цымбал[1], Н. А. Агаджанян[1], А. А. Штиль[2]

[1] Университет ИТМО, Санкт-Петербург
[2] Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

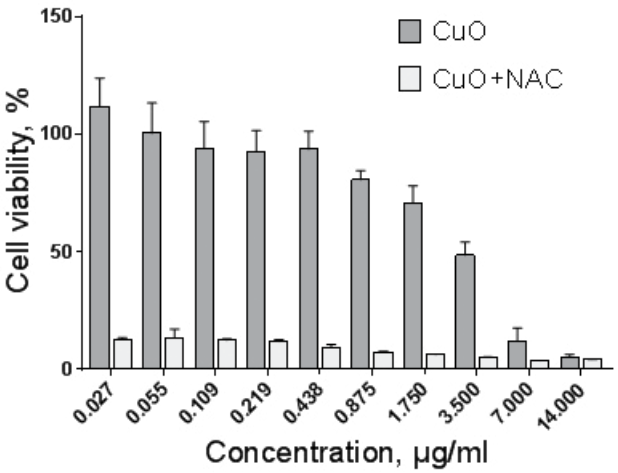
E-mail: zimbal@scamt-itmo.ru

Аннотация

Эффективность химиотерапии опухолей может в значительной мере лимитироваться формированием лекарственной устойчивости. В то же время нарушение баланса окисления-восстановления в опухолевой клетке рассматривается как перспективный подход для решения данной проблемы. В работе исследуются соединения меди и антиоксиданты, взаимодействие которых индуцирует генерацию активных форм кислорода (АФК). Возникновение окислительного стресса приводит к потере целостности плазматической мембраны и быстрой гибели опухолевых клеток, в том числе и с фенотипом сформированной лекарственной устойчивости.

Используя разнообразные механизмы, опухолевые клетки могут формировать лекарственную устойчивость, избегая негативного действия препаратов, провоцируя рецидив. Для преодоления резистентности требуются воздействия широкого спектра, эффективность которых не снизится в условиях сформированной лекарственной устойчивости. Окислительный стресс является стимулом, влияющим на функционирование множества клеточных систем и способным вызывать разнообразные нарушения. Применение индукторов окислительного стресса способно значительно улучшить результаты терапии в ситуациях, когда другие средства не показаны.

Цитотоксичность наночастиц (размер 80–350 нм), солей и органических комплексов меди в комбинации с N-ацетилцистеином оценивалась методом МТТ-теста. Концентрации веществ были подобраны таким образом, чтобы не вызывать клеточной гибели при отсутствии второго компонента. N-ацетилцистеин приводил к значительному увеличению цитотоксического потенциала наночастиц CuO (см. рисунок).



Цитотоксичность наночастиц CuO в отсутствии и присутствии N-ацетилцистеина

Клеточная смерть развивалась в первые 6–8 ч и отмечена для клеточных линий хронического миелоидного лейкоза K562, аденокарциномы кишки HCT116, трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231, аденокарциномы яичника SCOV-3 и других, в том числе для сублиний с лекарственной устойчивостью, например, K562/4 (множественная лекарственная устойчивость). Проточная цитофлуориметрия и конфокальная микроскопия использовались для оценки индукции АФК и изменения морфологии и физиологии митохондрий, а также регистрации падения митохондриального потенциала. Механизм гибели был изучен с помощью окрашивания Аннексином V и иодидом пропидия, анализом клеточного цикла, иммуноблоттингом на каспазы и поли(АДФ-рибоза)-полимеразу (PARP). Из полученных данных следует, что клеточная гибель протекает по механизму ка-

© А. Цымбал, Н. А. Агаджанян, А. А. Штиль, 2021

спазонезависимого апоптоза с нарушением целостности плазматической мембраны. Изучение молекулярных превращений в бесклеточной системе выявило высокую способность N-ацетилцистеина восстанавливать одно- и двухвалентную медь и нарушать проницаемость искусственных мембран. Масс-спектрометрический анализ выявил формирование цистеиновых димеров, соединенных дисульфидными связями, а также координирование восстановленных ионов меди в металлоорганических комплексах. Проведены предварительные эксперименты на мышах для определения минимальных переносимых доз для дальнейшей работы.

Таким образом, комбинации медьсодержащих соединений (наночастиц, органических комплексов, солей) и N-ацетилцистеина высокоэффективны для опухолевых клеток различного гистогенеза, в том числе подтипы с приобретенной лекарственной устойчивостью. Генерация АФК приводит к множественным необратимым изменениям, сводящимся к повреждению плазматической мембраны и быстрой каспазонезавимой гибели. Выявленные на лабораторных мышах диапазоны переносимых доз позволят перейти к испытаниям на опухолевых моделях полостных метастазов для определения эффективности работы комбинаций в условиях *in vivo*.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГИПЕРВИРУЛЕНТНОЙ *K. PNEUMONIAE* В РОССИИ

Э. Р. Шайдуллина[1,2], М. В. Эйдельштейн[2], А. М. Марданова[1]

[1] *Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета*
[2] *НИИ антимикробной химиотерапии*
Смоленского государственного медицинского университета Минздрава России

E-mail: Aoisora86@gmail.com

Аннотация

Klebsiella pneumoniae является важным госпитальным патогеном и одним из самых проблемных возбудителей во всем мире, в первую очередь за счет возрастания в популяции доли изолятов со множественной резистентностью к противомикробным препаратам. Однако в последние десятилетия особый патотип *K. pneumoniae* — гипервирулентная *K. pneumoniae* (hvKP) — становится все более значимым возбудителем, способным вызывать как госпитальные, так и внебольничные инфекции.

Гипервирулентная *K. pneumoniae* является одним из наиболее проблемных патогенов во всем мире. По сравнению с классической линией *K. pneumoniae* (cKP) hvKP характеризуется значительно более высокой вирулентностью и способностью вызывать инфекции у здоровых людей. Впервые появившись в странах Азии, на сегодняшний день hvKP имеет глобальное распространение. За широкое распространение изолятов hvKP ответственно небольшое число генетических линий, выделяемых внутри популяции *K. pneumoniae*. В первую очередь это изоляты, относящиеся к клональной группе CG23; менее распространены CG25, CG65, CG86 и CG380. Исторически штаммы hvKP более чувствительны к антибиотикам по сравнению с cKP. Однако в настоящее время hvKP становятся все более устойчивыми за счет приобретенных генов резистентности, и в первую очередь карбапенемаз различных групп.

Цель нашего исследования — проанализировать молекулярную эпидемиологию *K. pneumoniae* в России и определить долю изолятов, относящихся к гипервирулентным линиям *K. pneumoniae*.

Всего было изучено 2221 неповторяющийся клинический изолят *K. pneumoniae* из 35 городов России, собранный в рамках многоцентрового исследования, проводимого в России в 2018–2019 гг. Генетическое разнообразие определяли методом типирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-типирование). Разработанный метод SNP-типирования *K. pneumoniae* основан на анализе 21 информативного SNP в 7 хромосомных локусах: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* и *tonB*, используемых в схеме мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) Института Пастера. Наличие наиболее часто встречающихся приобретенных генов карбапенемаз (*blaOXA*-48, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM* и *blaIMP*) определяли с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

На основании SNP-типирования изученные изоляты *K. pneumoniae* были отнесены к 149 генотипам. Несмотря на большое генетическое разнообразие, наибольшее распространение показывают всего несколько линий: CG395 (соответствующий SNP-тип 395), CG23 (SNP-тип 23), CG307 (SNP-тип 307), CG147 (SNP-тип 147) и CG258 (SNP-типы 512, 11 и 340). В общей сложности эти пять генотипов составляют 67,2 % популяции *K pneumoniae* в России. Изоляты hvKP занимают второе место по распространенности и составляют 12,9 %. Доминирующим клоном среди hvKP является CG23 (SNP-типы 23 и 218) — 11,3 %, который обнаружен в 29 городах России. Чаще всего изоляты CG23 встречаются в трех городах: Казани, Улан-Удэ и Смоленске. Также в России встречаются hvKP, относящиеся к другим клонам: CG380 (SNP-тип 380) — 0,7 % (7 городов), CG65 (SNP-тип 65) — 0,6 % (7 городов) и CG25 (SNP-тип 25) — 0,4 % (8 городов).

Среди 286 изолятов hvKP 112 (39,2 %) являются продуцентами карбапенемаз, из которых у 107 (37,4 %) обнаружен ген карбапенемазы, относящейся к группе OXA-48; у 5 (1,7 %) обнаружена металло-β-лактамаза группы NDM. Все изоляты hvKP, проявляющие карбапенемазную активность, относились к CG23.

Исследование выявило вероятное распространение клонов hvKP в пределах страны, а также установило частоту встречаемости распространенных групп карбапенемаз среди изолятов гипервирулентного патотипа *K. pneumoniae*.

© Э. Р. Шайдуллина, М. В. Эйдельштейн, А. М. Марданова, 2021

ОПТИМИЗАЦИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕНОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ДЕЗОКСИРИБОЗИМНЫМИ БИНАРНЫМИ СЕНСОРАМИ*

Л. А. Шкоденко, М. С. Рубель, Ю. И. Мальцева

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург

E-mail: shkodenko@scamt-itmo.ru

Аннотация

В настоящее время заболевания центральной нервной системы (ЦНС) представляют серьезную проблему для здравоохранения, так как вызывают большое количество осложнений и высокий уровень смертности. Диагностика данных заболеваний является трудоемкой из-за высокой стоимости молекулярных методов и наличия высококвалифицированного персонала, а также из-за длительности микробиологических методов. В связи с этим необходима разработка тест-системы, которая снизит стоимость исследований и упростит их проведение.

Разрабатываемая в представленном проекте тест-система будет включать в себя экстракцию, амплификацию и детекцию нуклеиновых кислот в рамках одного устройства. Система будет способна детектировать бактериальные и вирусные мишени. Новизна данного устройства заключается в использовании уникальных бинарных сенсоров, способных генерировать цветовой сигнал при взаимодействии с аналитом, и являющимися одновременно и методом визуализации, и дополнительной верификацией наличия необходимого фрагмента. Однако для успешной детекции необходима оптимизация экстракции и амплификации нуклеиновых кислот.

Целью данной работы является оптимизация выделения мультиплексной амплификации и мультиплексной детекции нуклеиновых кислот вирусов и бактерий для интеграции данных процессов в тест-систему закрытого типа для быстрой диагностики инфекций ЦНС.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выбор оптимального способа выделения бактериальных и вирусных нуклеиновых кислот.
2. Оптимизация методов изотермической амплификации бактериальных и вирусных нуклеиновых кислот.

Для разработки системы были выбраны следующие микроорганизмы, поражающие ЦНС: *Streptococcus pneumonia*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis,* Epstein — Barr virus, Varicella zoster virus, Herpes simplex virus 1,2, Cytomegalovirus, Coxsackievirus

Данные организмы были разделены на следующие мультиплексные группы:

1. Escherichia coli, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, Epstein — Barr virus, Cytomegalovirus.

2. Haemophilus influenza, Coxsackievirus, *Streptococcus pneumonia*, Herpes simplex virus 1,2.

3. Staphylococcus aureus, *Mycobacterium tuberculosis*, Varicella zoster virus, *Streptococcus agalactiae*.

Для оптимизации процесса выделения нуклеиновых кислот использовали несколько лизирующих буферов, самым оптимальных из которых оказался буфер, состоящий из 0,25 % SDS и 50 мМ NaOH. Сорбция нуклеиновых кислот из лизирующего буфера проходила на наночастицы магнетита, синтезированного лабораторией нанофармацевтики института SCAMT, университет ИТМО. В состав мультиплексной реакции NASBA входили праймеры для каждого из четырех или пяти патогенов определенной мультиплексной группы и РНК каждого из патогенов; параллельно происходила одновременная амплификация всех патогенов. Детекция амплифицированных продуктов проводилась с помощью уникальных дезоксирибозимных бинарных сенсоров и подтверждалась в 2 % агарозном геле.

В результате работы был подобран оптимальный лизирующий буфер для быстрой экстракции нуклеиновых кислот. Была произведена оптимизация мультиплексной амплификации NASBA для 14 патогенов. Электрофоретический анализ продуктов амплификации показал наличие ампликонов в каждом из вариантов мультиплекса. В результате оптимизации мультиплексной детекции были подобраны сенсоры, обладающие высокой специфичностью к аналитам.

В дальнейшей планируется оптимизация других видов изотермической амплификации (Loop-mediated isothermal amplification, stem loop-mediated isothermal amplification) для последующей детекции продуктов амплификации дезоксирибозимными сенсорами.

© Л. А. Шкоденко, М. С. Рубель, Ю. И. Мальцева, 2021

* Исследование выполнено при поддержке ФГБУ «ЦСП» Минздрава России.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА TGFB2 НА РАЗВИТИЕ ИСТОНЧЕНИЯ РОГОВИЦЫ ПРИ СИНДРОМЕ ЛОЙСА — ДИТЦА

Б. О. Щеглов

Школа медицины
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

E-mail: b.shcheglov@mail.ru

Аннотация

Синдром Лойса — Дитца — это аутосомно-доминантный синдром аневризмы аорты, характеризующийся ее мультифакторным поражением. Наиболее типичная клиническая триада включает гипертелоризм, волчью пасть и аневризму аорты с извилистостью Генетическая этиология негомогенна и включает мутации в генах, кодирующих компоненты сигнального пути трансформирующего фактора роста бета (TGFβ): TGFBR1, TGFBR2, SMAD3 и TGFB2. Несмотря на Loss Function (LoF) природу этих мутаций, ткани аорты пациентов, страдающих данным заболеванием, свидетельствуют о повышенной (а не пониженной) передаче сигналов TGFβ.

Цель работы

Исследование влияния и роли гаплонедостаточности TGFB2 на фенотипическое проявление уровня толщины роговицы у пациентов с синдромом Лойса — Дитца 4-го типа.

Материалы и методы

Изучение базы данных OMIM для обнаружения связи данного гена с наследственной патологией. Информация о возможных мутациях была получена из баз данных: ClinVar Short Variants, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Непосредственно биоинформатический анализ гена происходил в системе UCSC Genome Bromser и Zenbu.

Результаты

Данный ген экспрессируется во многих клеточных линиях (согласно данным ZENBU). Однако в клеточных линиях, представленных в геномном браузере UCSC Genome Browser, экспрессия гена наблюдается слабая.

CpG-островок соответствует экзону, что соотносится с проведением регуляции экспрессии генов путем метилирования. Транскрипционные факторы влияют на транскрипцию гена. Трек чувствительности к ДНКазе показывает, что в 43 из 125 клеточных линий ДНКаза может связываться с транскрипционными факторами. Пик ацетилирования влияет на регуляцию экспрессии гена.

По данным рибосомного профайлинга, были обнаружены высокоапмлитудные GWIPS пики — это означает, что рибосома соединилась с мРНК и началась трансляция. Все пики соответствуют экзонам.

По данным RNA-seq, большая часть РНК находится в хроматине (53 %). Большая часть РНК не имеет polyA-конца.

В ходе анализа литературы базы данных OMIM было выявлено влияние гаплонедостаточности гена TGFB2 на развитие симптоматики у восьми пациентов с синдромом Лойса — Дитца 4-го типа, с характерным истончением роговицы и каплевидную роговицу, несмотря на молодой возраст и отчетливые мутации в TGFB2 (c.905G>A, p.Arg302His; c.988C>A, p.Arg330Ser). В третьем семействе истончение роговицы сочеталось с мутацией TGFB2 (c.1103G>A, p.Gly368Glu), хотя и без видимых изменений.

Выводы

Данный ген вызывает у пациентов с синдромом Лойса — Дитца 4-го типа истончение или каплевидную форму роговицы как за счет точечных мутаций в кодирующей части гена, так и за счет делеций и дупликаций сайта сплайсинга, затрагивающих всю область этого гена. Данные демонстрируют важность рассмотрения различных корреляций фенотип-генотип в этом состоянии.

© Б. О. Щеглов, 2021

КОДИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МЕТОКСИАМИНА — ИНГИБИТОРА РЕПАРАЦИИ ДНК С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ*

А. В. Юдкина, Д. О. Жарков

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

E-mail: ayudkina@niboch.nsc.ru

Аннотация

Рак — одна из наиболее распространенных причин смерти в мире. Химиотерапия и радиотерапия до сих пор остаются основными способами лечения онкологических заболеваний, однако из-за их высокой токсичности и постепенного возникновения резистентности у раковых клеток к этим видам терапии необходима разработка новых стратегий лечения опухолей. Наиболее частая причина приобретения клетками опухоли устойчивости к химио- и радиотерапии — работа механизмов репарации ДНК, в частности, эксцизионной репарации оснований (ЭРО).

Метоксиамин — это первый ингибитор непосредственно ферментов пути ЭРО, который эффективно сенсибилизирует клетки опухоли к широкому спектру агентов, повреждающих ДНК. Метоксиамин — это небольшая молекула, которая формирует конъюгат с апурин/апиримидиновыми (АП) сайтами ДНК и предотвращает их расщепление АП-эндонуклеазой APEX1, одним из ключевых ферментов пути ЭРО. Несмотря на то, что на сегодняшний день метоксиамин проходит несколько клинических испытаний разных фаз, до сих пор не изучены механизмы влияния метоксиаминовых аддуктов с АП-сайтами на ферменты метаболизма ДНК.

В рамках работы мы исследовали способность ДНК полимераз разных семейств проходить конъюгат АП-сайта с метоксиамином в сравнении с альдегидным АП-сайтом. Мы получили кинетические параметры включения нуклеотидов напротив данных повреждений в условиях стационарной кинетики для ряда ДНК-полимераз, принадлежащим семействам A, B, X, Y. Также мы изучили предпочтение ДНК-полимераз к включению нуклеотида напротив данных повреждений в условиях процессивного синтеза.

Оказалось, что устойчивый к действию ферментов ЭРО конъюгат метоксиамина с АП-сайтом не усиливает мутагенные свойства исходного альдегидного АП-сайта. Таким образом, отсутствие повышенных промутагенных свойств предполагает относительную безопасность метоксиамина как потенциального противоопухолевого препарата с синергическим эффектом с повреждающими ДНК агентами.

© А. В. Юдкина, Д. О. Жарков, 2021

* Работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-174.2021.4.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Akanova K. S. ... 236
Akhatov I. Sh. ... 44
Alexyuk M. S. ... 236
Anarkulova E. I. ... 236
Andriianova A. I. ... 256
Andriyanov V. S. ... 256
Bardina M. V. ... 32
Batsa M. ... 279
Bazarova E. L. ... 265
Berezikov E. V. ... 265
Biryukov M. Yu. ... 265
Bobkov G. A. ... 279
Boyko A. V. ... 266
Budkina A. Y. ... 239, 244
Chudakov D. M. ... 388
Dmitrieva A. M. ... 265
Dolmatov I. Yu. ... 266
Drozd V. S. ... 276, 299, 340
Dubovichenko M. V. ... 279
Egorova T. V. ... 32
Eldeeb A. A. ... 253, 276, 340, 363, 365
Fedotkin A. Y. ... 74
Fisenko P. V. ... 250
Ishemgulov A. T. ... 148
Joshi V. ... 302
Kalnin A. I. ... 299
Kaptelova V. V. ... 244
Kim I. V. ... 250
Kirillov B. A. ... 44
Kolesnikov A. A. ... 244
Kolosova O. S. ... 299
Korneenko E. V. ... 239
Koshel E. I. ... 126
Lavrik O. I. ... 302
Letuta S. N. ... 148
Lunev E. A. ... 32
Mayakovskaya A. V. ... 156
Mamontova E. M. ... 302
Marakulina D. A. ... 244
Maryin P. V. ... 74
Matsishina N. V. ... 250
Mitin D. E. ... 158, 160
Moldakhanov Y. S. ... 236
Mungalov R. V. ... 388
Nour M. A. Y. ... 253, 363
Osetrov K. O. ... 43
Pakhomova K. A. ... 44
Pasko A. A. ... 44
Pastré D. ... 302
Patra C. ... 365
Petrov K. D. ... 158, 160
Rumyantceva V. I. ... 124, 126
Shmidt A. A. ... 32
Smirnov V. V. ... 276, 299, 340
Sobko O. A. ... 250
Sukhanova M. V. ... 302
Suvorov D. A. ... 158, 160
Turchaninova M. A. ... 388
Ustyantsev K. V. ... 265
Vassilieva S. G. ... 32
Vinogradov V. V. ... 124
Volynets G. P. ... 156
Wanjohi J. ... 253
Zablotskaya S. ... 363

Абакаров Г. М. ... 190
Абакумов М. А. ... 12, 76
Абдуллин Т. И. ... 41, 109
Абдулхаков С. Р. ... 304
Агаджанян Н. А. ... 396
Агладзе К. И. ... 161
Адиева А. А. ... 190
Адильгереева Э. П. ... 284
Адищев С. В. ... 145
Адонина С. Н. ... 255
Азарнова Т. О. ... 336
Айгинин А. А. ... 213, 331
Акильжанова А. Р. ... 258
Акимкин В. Г. ... 59, 214, 226, 239, 244
Акматова Ж. К. ... 242
Аксёнов-Грибанов Д. В. ... 16, 46
Актанова А. А. ... 138
Акулина Е. А. ... 72
Алексеев А. А. ... 135
Андреева И. С. ... 386
Анисименко М. С. ... 24
Анискина А. И. ... 286
Антонец Д. В. ... 296, 354
Антонец Д. В. ... 66
Антосюк О. Н. ... 35
Аньков С. В. ... 139
Артемов Н. Н. ... 272
Артюшин И. В. ... 246
Архипов М. О. ... 3
Асташонок А. Н. ... 237
Асыбалиева Н. А. ... 242
Афанасьев С. Г. ... 295
Афанасьева А. И. ... 52
Ахальцева Л. В. ... 312
Ахмадуллина Ф. Ю. ... 60
Ахметова А. Ж. ... 258
Ахметова Д. А. ... 259
Ахметова Е. А. ... 369
Бабаков А. В. ... 30
Бабич О. О. ... 93
Бабошко Д. А. ... 188
Бабурина Ю. Л. ... 382
Бабченко В. Я. ... 9
Бабышкина Н. Н. ... 277
Багрянская Е. Г. ... 162
Бадриева П. М. ... 190
Бажан С. И. ... 66
Базовкина Д. В. ... 255, 274, 326
Байкалов Г. И. ... 5
Байков И. К. ... 212
Байтин Д. М. ... 135
Бакланов А. М. ... 139
Бакланов И. Н. ... 6, 21, 321
Балабаньян В. Ю. ... 61
Балашов Л. Д. ... 170
Балдов Д. А. ... 157
Баранова О. А. ... 108, 133
Барашкова А. С. ... 208
Баскунов Б. П. ... 54
Батищев О. В. ... 144
Бауэр И. А. ... 260
Бахарева К. И. ... 5
Бахно И. А. ... 8
Баширзаде А. А. ... 9
Бекболотов А. А. ... 242
Бекшоков К. С. ... 190
Беленькая С. В. ... 10, 38–39, 261
Белишев Н. В. ... 72
Белов С. В. ... 210
Белова А. С. ... 9
Белокопытова И. И. ... 262
Белышенко А. Ю. ... 16, 46
Белявцев А. Н. ... 238
Бережной А. К. ... 161, 177
Березенкова Н. В. ... 383
Берлина Ю. Ю. ... 214, 226
Берсенева А. А. ... 263
Бирулина Ю. Г. ... 137

Благодатских С. А. 226
Богун А. Г. 226
Боева О. С. 138
Бойко И. Ю. 94
Болотник Е. В. 35
Бонарцев А. П. 72
Бондарь А. А. 153, 386
Боргоякова М. Б. 10, 248, 357
Борисевич С. С. 220
Борисова М. А. 24
Борисова Н. И. 226, 244
Бормотов Д. С. 320
Бормотов Н. И. 220
Боуман М. 162
Бочаров К. В. 355
Бочаров Э. В. 370
Бочкарева М. Д. 193
Бояринцев В. В. 141
Браун Л. А. 271, 283
Брус Т. В. 170
Будячок О. В. 267
Буйко Е. Е. 137
Буланенко В. П. 214, 226
Булгакова А. Е. 11
Бунева В. Н. 310, 375
Буслаев В. Ю. 269
Бухарина А. Ю. 393
Быковский В. В. 59
Вагнер В. Д. 153
Валдохина А. В. 214, 226
Валиулин С. В. 139
Варпетян Э. Э. 271, 283
Васильев А. Г. 170
Васильева Т. В. 315
Вахренев Р. Г. 238
Веснина А. Д. 95
Вигонт В. А. 140
Винокуров М. А. 269
Вишневский Д. А. 12
Владимирова А. В. 13
Водопьянов С. С. 76
Воинова В. В. 72
Войтик К. Д. 105
Волкова М. В. 141
Волкова Н. В. 10
Волковинская П. А. 271, 283
Волосникова Е. А. 10, 357
Волченко Н. Н. 102
Воробьев Р. С. 272
Воронина Е. С. 284
Ворошилин Р. А. 97
Вохтанцев И. П. 332
Вязов Е. В. 99
Габашвили А. Н. 76
Гавирова Л. А. 101
Гавриленкова А. А. 370
Гайдина А. С. 54
Гайдученко Е. С. 273, 308
Гайнанова Г. А. 41
Галеева Е. В. 331
Галзитская О. В. 307
Ганцова Е. А. 370
Гаптулбарова К. А. 194, 267
Гаранин А. Ю. 24
Гаранина А. С. 12
Гарифуллин Р. И. 41
Гасюк О. А. 102
Гашникова М. П. 242
Гашникова Н. М. 188, 215, 242
Геращенко Т. С. 272
Гисич А. В. 142
Гладышева А. А. 196
Гладышева А. В. 196
Глущенко А. В. 240
Гогниева Д. Г. 110
Головенчик В. И. 273
Голота О. В. 232
Голубева А. Г. 214, 226
Голышев В. М. 371
Гончарик Р. Г. 99
Гончаров Н. В. 6, 21, 321
Горбенко Д. А. 384
Горбунова Е. А. 14
Гордукова М. А. 331
Горчакова О. В. 42
Горященко А. С. 370
Готлиб Е. М. 121
Гражданцева А. А. 200, 247
Грачев Е. А. 155, 165
Грехнев Д. А. 140
Григоренко А. П. 319, 323
Григорьева А. В. 137
Григорьева Е. В. 15
Григорьева Т. А. 289
Григорьева Т. В. 304
Григорьева Ю. Д. 274
Гришин С. Ю. 307
Гулая В. С. 6, 21, 321
Гуляева М. А. 231
Гурков А. Н. 40
Гусев Ф. Е. 319, 323
Гуцалова А. А. 104
Данилин Н. А. 371
Данилова А. Л. 58
Дарнотук Е. С. 105, 133
Дворник Ю. В. 394
Де Дзотти М. 164
Дедков В. Г. 246
Деев И. Е. 370
Демкин В. П. 143, 185
Дениева З. Г. 144
Денисов Е. В. 272
Дергилева А. Д. 381
Дёрко А. А. 240
Дерюшева Е. И. 275
Деулин И. Ю. 198, 217, 221, 223
Джус У. Ф. 307
Дзюба С. А. 164
Диченко Я. В. 333
Дмитриева М. Е. 16
Дмитриенко Е. В. 11, 15, 48, 260
Добрынина Е. А. 145
Добрякова Н. В. 17
Довыденко И. С. 8, 45
Докукина И. В. 155, 165
Долгашева Д. С. 194, 267, 291
Драгунова С. Г. 186
Дрибноходова О. П. 393
Дроздова М. Ю. 106
Дроздова П. Б. 40
Дронова Т. А. 277
Дубовицкий Н. А. 240
Дубоделов Д. В. 214, 226
Дубцов С. Н. 139
Дуденкова А. С. 281
Дудко Н. А. 323
Дудорова А. В. 214
Дунаева Е. А. 393
Дурыманов А. Г. 206
Дурыманов М. О. 141
Дышлюк Л. С. 106, 131
Дьячкова А. А. 271, 283
Дятлов И. А. 226
Дятлова А. С. 316, 373
Евстифеев Е. А. 59
Егорова А. Д. 18, 54
Екушов В. А. 215
Екушов В. Е. 188, 242
Елиферов В. А. 355
Ельчанинова С. А. 216
Емельянова Л. А. 212, 232
Епанчинцева А. В. 14, 19
Еремин Д. В. 274
Ермаков Е. А. 310, 375
Ермаков М. С. 290, 329
Ерофеева Т. В. 323
Ерошин А. И. 20
Ершов К. И. 5
Ершова Е. С. 392
Есьман А. С. 243, 393
Ефимова С. С. 235
Ефремов Н. А. 361
Ефремов Ю. М. 172
Жарков Д. О. 401
Жаркова И. И. 72
Жданов Д. Д. 17
Жегло Д. Г. 284
Живаева Т. С. 211
Жменя В. М. 21, 321
Жуковская А. А. 143
Забелина Д. С. 200
Заболотский А. И. 117
Заварзина В. В. 89
Заворотнюк Д. С. 320

Завьялов Е. Л. 64
Задорожный А. М. 10, 248
Зайковская А. В. 10, 357
Зайцева Ю. В. 146
Зайчатникова К. И. 76
Запарина О. Г. 297, 347
Захаров З. В. 107
Захарова К. С. 286, 359
Зацепин Т. С. 369
Здерева Е. А. 201
Зеленцова Е. А. 159
Земерова Т. П. 288
Зенина А. Д. 289
Зернышкина А. А. 78
Зилов Д. С. 23
Зинченко Н. Д. 290
Злобин Н. Е. 30
Знобищева Е. А. 135
Зотова М. И. 214, 226
Зухайб М. 41
Зыбин Д. И. 161
Зырянова Д. П. 242
Ибрагимова М. К. 194, 201, 267, 291, 293
Иванова Л. А. 30
Ивкина Д. И. 203
Ивлев В. В. 242
Игнатов К. Б. 24
Идиятов И. И. 20
Иконникова А. Ю. 115
Ильина Е. А. 215
Ильичёв А. А. 10, 31, 327, 357
Ильичёва Т. Н. 206, 234
Ильчибаева Т. В. 262, 274, 326
Илющенко В. В. 25
Иматдинов И. Р. 69, 193, 203, 225, 228, 230
Имидоева Н. А. 16, 46
Ингель Ф. И. 312
Иншакова А. М. 108, 133
Исаева А. А. 10
Исаченко А. И. 101
Ищук С. А. 86
Кабачевская Е. М. 181
Кадырбеков У. К. 242
Казакова А. В. 86
Казакова А. Д. 295
Казакова Е. О. 295, 367
Казаринов К. Д. 133
Казимиров П. В. 376
Казначеева Е. В. 140
Калинина Т. С. 325
Калниня Я. К. 149
Камалов М. И. 109
Каманова Е. П. 296
Канарская М. А. 150
Каплина О. Н. 66
Каплун А. П. 119
Каптелова В. В. 214, 226
Капущак Я. К. 297
Карал-оглы Д. Д. 233
Карпенко Л. И. 10, 31, 55, 66, 151, 248, 318, 327, 349, 357
Карпова Е. В. 205, 208
Карташев А. А. 129
Кастыро И. В. 186
Кечин А. А. 45
Кжышковска Ю. Г. 295, 367
Кильчевский А. В. 361
Ким Д. В. 371
Кинаш Н. А. 59
Кирилюк И. А. 162
Кисаков Д. Н. 151, 248, 318
Киселев А. М. 272
Киселев В. В. 312
Киселев Д. А. 331
Кисиль С. И. 155
Кисличкина А. А. 226
Кислова А. В. 284
Кихтенко Н. А. 206
Клейман В. К. 186
Князев Р. А. 5
Кобякова М. И. 378, 381, 382
Ковалева К. С. 220
Коваленко С. П. 24
Коваль О. А. 329
Ковнер А. В. 347
Кожамкулов У. А. 258
Козел Н. В. 173, 175
Козлова И. В. 212
Козловская Л. И. 205, 208
Кокшарова Г. С. 298
Колесанова Е. Ф. 238
Коломин Т. А. 186
Коломыцева М. П. 18, 54
Колосова Е. А. 216, 234
Колосова И. В. 248
Колпакова Е. С. 205, 208
Колпащиков Д. М. 253, 256, 276, 279, 288, 299, 315, 340, 363, 365, 384
Кольцов А. Ю. 209, 210
Кольцова Г. С. 209, 210
Комарова Л. Н. 263, 281
Комахин Р. А. 30
Комиссаров А. Б. 226
Комиссаров А. С. 23, 28, 328
Кондаурова Е. М. 262, 274
Кондрашева Л. Ю. 214, 226
Конев В. П. 153
Коновалова Л. Н. 30
Кононова П. А. 152
Конончук В. В. 259, 325
Коняхина Ю. В. 245
Коняшкина М. А. 312
Копейкина Е. В. 325
Копылов Ф. Ю. 110
Корнаков И. А. 86
Корнеенко Е. В. 214, 226, 246
Коротин А. В. 210
Коршунов А. С. 153
Косевич И. А. 323
Костюк С. В. 392
Костяева М. Г. 186
Котловская Л. Ю. 143
Котов И. А. 59, 214, 239, 244
Котова О. Н. 252
Кочнева Г. В. 200, 247
Кошкин А. О. 350
Кравцова А. А. 170
Краснова М. Е. 46
Крестинина О. В. 382
Кривкина Е. О. 26
Крищук И. А. 308
Крумкачева О. А. 162
Круть У. А. 27
Крутько С. А. 210
Кручинин В. Н. 145
Кручинина М. В. 145
Кудряшова Е. В. 17
Кузин А. А. 320
Кузнецов Н. Д. 186
Кузнецова В. Е. 132
Кузнецова Н. О. 110
Кузубова Е. В. 27
Кузьмин А. И. 188
Кулигина Е. В. 290
Куликов Ф. В. 271, 283
Куликова Е. А. 262, 326
Кумейко В. В. 6, 21, 321
Курилова А. Е. 226
Курьянчик Т. Г. 173
Курятников К. Н. 153
Кутихин А. Г. 337
Куцейкин С. С. 200
Кучур О. А. 379
Кучур П. Д. 28
Лаврентьева И. Н. 233
Лазарев И. В. 29
Лазукин А. А. 102
Лайков А. В. 304
Лактионов П. П. 330
Ларина В. В. 93
Ларионова И. В. 295, 367
Латыпов В. Ф. 86
Лахова Т. Н. 301
Лашин С. А. 301
Лебедева А. Ю. 226
Лебедева М. В. 30
Лебедева Н. Ш. 162
Левданский О. Д. 380
Лешкина Г. В. 393
Лиознов Д. А. 226
Липинская Т. П. 273

Литвинова В. Р. 31, 318
Литвяков Н. В. 267, 291, 293
Литус Е. А. 275
Лобанова Я. В. 111
Логвина Н. А. 369
Локтев В. Б. 196
Ломзов А. А. 48, 150
Ломовская Я. В. 378, 381–382
Ломовский А. И. 378, 381–382
Лопаткин А. А. 211
Луговая И. С. 336
Лунева О. В. 34
Лутфуллина Г. Ф. 123
Ляпунова Е. Р. 281
Магомбе Н. 35
Мадонов П. Г. 5, 206
Мазуркова Н. А. 224
Майкова А. С. 383
Максименко Л. В. 249
Максимова Н. Р. 58
Максютов Р. А. 242
Малиновская Ю. А. 12
Малышева К. О. 113
Мальцева Ю. И. 384, 399
Манеева Е. П. 240
Марданова А. М. 123, 398
Маркелова М. И. 304
Маркель А. Л. 335
Маркович В. А. 267
Мартышина А. В. 155
Марченко В. Ю. 66
Матвеев А. Л. 212, 232
Махалова К. И. 305
Мацвай А. Д. 213, 331
Мачулин А. В. 307
Машков Е. И. 308
Медведева Е. И. 175
Медетова Г. М. 37
Меджидов М. А. 190
Меджидова М. Г. 190
Меламуд М. М. 310
Мельникова А. А. 157
Мельникова М. В. 238
Меркульева Ю. А. 38, 386
Мещанинова М. И. 305, 371
Милаёва И. В. 183
Миронов К. О. 243, 393
Мифтахов Р. А. 115
Михайлов И. М. 213, 312, 331
Михаленко Е. П. 361
Мишук Е. А. 380
Мкртчян А. Ф. 27
Можаровская Л. В. 313
Моллаев М. Д. 117
Моллаева М. Р. 61, 89, 117, 119
Моргунова М. М. 16, 46
Мордвинов В. А. 297, 347
Моренко Е. О. 105
Морозов А. Н. 107
Мостовщикова П. С. 323
Моторов У. Т. 242
Мурашкина А. А. 312
Мурашкина Т. А. 240
Мухин А. М. 301
Мухина И. В. 184
Мыров В. О. 9
Мысин М. А. 56
Мясоедова Н. М. 54
Надтока М. И. 214, 226, 246
Назаркина Ж. К. 330
Назаров К. Д. 39
Назарова А. А. 40
Налимова Т. М. 215, 242
Нарматова Э. Б. 242
Науменко В. А. 12
Науменко В. С. 262, 274, 326
Невинский Г. А. 375
Недорезова Д. Д. 256, 276, 315, 340, 365
Немашкалова Е. Л. 275
Непомнящих Т. С. 296
Несмеянова В. С. 10
Нестерко Е. Э. 316, 373
Нетёсов С. В. 200
Нигматуллина Р. Т. 121
Низамов Т. Р. 76
Никитин А. О. 216
Никитина Т. А. 312
Николаева А. А. 123
Николаева В. А. 41, 109
Николаева Л. И. 238
Николайчук К. М. 42
Никольская Е. Д. 61, 89, 117, 119
Новикова Д. С. 390
Новопашина Д. С. 305, 332, 371
Носкова С. Ю. 93
Нуштаева А. А. 290, 329
Овчинникова Е. О. 217, 223
Ода В. В. 76
Окотруб К. А. 145, 168
Онищук А. А. 139
Орешко В. В. 220
Орлова Л. А. 10, 151, 318
Осик Н. А. 159
Осипов Г. В. 184
Осипов И. Д. 200
Осипова И. П. 188, 242
Ословский В. Е. 205
Осолодкин Д. И. 205
Остроумова О. С. 235
Остроушко А. А. 59
Охлопкова О. В. 67
Очкалова С. Д. 23, 328
Ощепков Д. Ю. 301
Павлов Р. В. 41
Павлова А. С. 25
Павлюк А. М. 109
Панкова О. В. 272
Патрикеев А. Д. 319, 323
Патышева М. Р. 295, 367
Пахарукова М. Ю. 347, 297
Пашкина Е. А. 138
Пеков С. И. 320, 355
Пенькова А. О. 21, 321
Переверзев И. М. 345, 45
Перельмутер В. М. 272
Переляева Е. В. 16, 46
Пермяков С. Е. 275
Перушкина Е. В. 84, 12
Першина А. Г. 344
Петренко А. Г. 370
Петухова Т. Е. 47
Плотникова М. Ю. 323
Побегалов Г. Е. 135
Подольская Е. П. 149
Пожарский А. А. 390–391
Пожитнова В. О. 284
Полещук Н. Н. 237
Поляков Н. Э. 152
Полякова А. А. 324
Помулев В. А. 198, 221
Понасенко А. В. 337
Попадюк В. И. 186
Попов И. А. 320, 355
Попов М. А. 161
Попова В. К. 48
Попыванов Д. В. 49
Примакова Е. О. 223
Проскурнина Е. В. 180, 392
Прохоров О. Б. 325
Прохорова Д. В. 348
Проценко М. А. 224
Пурвиньш Л. В. 51
Пушкарев И. А. 52
Пшеничникова А. Б. 105
Пышная И. А. 14, 19, 25
Пышный Д. В. 19
Пьянков О. В. 10, 357
Пьянков С. А. 247, 248
Пюрвеев С. С. 170
Пятавина Л. А. 225
Радченко А. И. 27
Разумов И. А. 64
Ракина М. А. 295
Редина О. Е. 335
Ренфельд Ж. В. 18, 54
Римская Б. А. 177
Рихтер В. А. 329
Рогаев Е. И. 319, 323
Рогачев Е. А. 153
Рогожин Е. А. 208
Родионов Е. О. 194, 272
Родный А. Я. 326
Роев Г. В. 226

Рожков О. А. 188
Романенко М. В. 200
Романова С. Г. 161
Рубель М. С. 288, 384, 363, 399
Руденко Т. В. 143, 185
Рудомётов А. П. 10, 151, 31, 318, 327, 357
Рудомётова Н. Б. 55, 327, 349
Румянцев А. М. 92
Рысков А. П. 328
Рябиков В. В. 56
Ряховский С. С. 328
Саввина М. Т. 58
Савинкова М. М. 329
Савинова Е. А. 180, 392
Савиновская Ю. И. 290
Савостьянова Т. А. 330
Сагайдак А. В. 391
Садыкова Д. Ф. 121
Саенко С. С. 214, 226
Сай А. В. 213, 331
Саковина Л. В. 332
Саламайкина С. А. 243, 393
Салахутдинов Н. Ф. 55, 220, 349
Самков А. А. 102
Самович Т. В. 175
Самойлов А. Е. 59, 214, 226, 246
Санникова Н. Э. 162
Сапронов Г. В. 238
Сафина А. М. 121
Саченко А. Б. 333
Северина В. А. 127
Северюхин Ю. С. 163
Седых С. Е. 51, 249, 252
Селезов С. Ю. 214, 226
Селиванов П. А. 128
Селютина О. Ю. 152
Семейкин А. С. 162
Семенов Д. В. 290
Семенова А. В. 247
Семиколенова О. А. 305, 371
Семкина А. С. 12, 76
Сенина А. М. 304
Сергеев А. А. 245, 248
Сергеева О. В. 369
Сергеенков С. В. 56
Сережкин И. Н. 101
Серова О. А. 224
Серова О. В. 370
Серяпина А. А. 335
Сивай М. В. 242
Сивицкая Л. Н. 380
Сиволобова Г. Ф. 247
Сидорин А. В. 92
Сидорова А. Ю. 336
Сизова А. А. 226
Сизова М. А. 200
Силкин С. В. 355
Синицкий М. Ю. 337
Синицын С. О. 59, 214, 226
Сиротина К. Ю. 60
Сироткин А. С. 84
Ситникова А. И. 51, 249
Скрябин Ю. П. 226
Скурихина А. П. 153
Сломинский П. А. 186
Слонимская Е. М. 277
Слотвицкий М. М. 161, 177
Смирнов А. С. 338
Смирнова Ю. С. 226, 246
Соболевская Э. В. 342
Созарукова М. М. 180
Сокол М. Б. 61, 89, 117, 119
Соколов Н. Н. 17
Соколова А. С. 55, 349
Солдатенко О. В. 129
Соловьёва Е. Д. 214, 226
Соловьёва О. И. 64
Соловьёва Э. Ю. 108, 133
Солодков П. П. 65
Соломенцев В. И. 226
Сорокин А. А. 320
Сохейл Азизи 9
Сперанская А. С. 59, 214, 226, 243, 246
Старожилова К. В. 127
Старостина Е. В. 10, 66, 248
Старчевская М. Е. 296
Сташкевич Д. С. 353
Степанов Г. А. 348
Степанова Д. С. 271, 283
Столбунова К. А. 67
Строкотов Д. И. 142
Субботина К. В. 343
Суворова А. О. 286, 359
Сульгин А. А. 69
Сульгина Т. В. 228
Супонин Д. А. 338
Сурин А. К. 307
Сурменев Р. А. 72
Сурменева М. А. 72
Суровцев Н. В. 146, 168
Суровцев С. В. 145
Сухер М. М. 210
Сухинина Е. В. 344
Сухих С. А. 93
Суховеева С. В. 181
Сухомлинов Д. И. 345
Сухомясова А. Л. 58
Сырямина В. Н. 164
Таранов В. В. 30
Тарасенко А. А. 347
Тарасова А. С. 295
Тельнова Т. Ю. 16, 46
Теплякова Т. В. 64, 67, 224
Терновой В. А. 196
Тикунова Н. В. 212, 232
Тилинова О. М. 155, 165
Тимашев П. С. 172
Тимирбаева Я. Д. 56
Тимофеев И. О. 162
Тимофеев М. А. 40
Тимофеева А. М. 249, 252
Титова К. А. 245, 248
Тишин А. Е. 230
Токальчик Д. П. 166
Токин Г. М. 71
Толстикова Т. Г. 139
Толстова П. О. 348
Торшин В. И. 186
Тотменин А. В. 188, 215, 242
Травникова Д. Ю. 72
Тремасова А. М. 20
Трофименко А. В. 141
Трубачева О. А. 137
Тузиков С. А. 267
Тюлина В. В. 183
Удут В. В. 143, 185
Успенская М. В. 34, 43
Устинов К. Д. 284
Ушкаленко Н. Д. 73
Фабушева К. М. 394
Фадеев Р. С. 378, 381, 382
Фандо А. А. 55, 318, 349
Фатеев А. Д. 34
Федин А. И. 108, 133
Федин М. В. 162
Фёдорова Ю. А. 351
Фёдорова Я. В. 350
Федотов К. А. 76
Федотова М. С. 42, 231
Федотчева Т. А. 338
Фефелова Е. И. 284
Филатова Т. А. 78
Филиппова А. Ю. 231
Филиппова Е. И. 224
Филонов Д. О. 286
Фильков Г. И. 141
Флеер М. В. 188
Формаджо Ф. 164
Фотина Н. В. 131
Фролова Ш. Р. 161
Фурсова А. Ж. 206
Хабибуллина А. Р. 84
Халиуллина А. М. 121
Ханова М. Ю. 80
Харитонов Л. С. 81
Харьковская Е. Е. 184
Хасанова А. А. 84
Хасаншина З. Р. 86
Хаснатинов М. А. 240
Хафизов К. Ф. 59, 213–214, 226, 239, 244
Хафизова И. С. 84

Хлусевич Я. А. 212, 232
Ходорковский М. А. 135
Хозяинова А. А. 272
Холдина А. М. 88
Холина М. С. 72
Хорина Н. А. 211
Храмов М. В. 226
Хрипко О. П. 198, 217, 221, 223
Хрипко Ю. И. 198, 217, 221, 223
Худокормов А. А. 102
Хуснутдинова Д. Р. 304
Царева Н. В. 352
Царькова М. С. 183
Цвелая В. А. 161, 177
Центалович Ю. П. 159, 162
Цепокина А. В. 337
Цибулина А. О. 185
Цыганков М. А. 92
Цыганов М. М. 194, 267, 291, 293
Цыденова И. А. 194, 267, 293
Цымбал С. А. 396
Чеканов А. В. 108, 133
Челобанов Б. П. 330
Чердынцева Н. В. 277
Черкашина А. С. 214, 226, 243
Черных А. М. 18, 54
Чернышева А. А. 12
Чиркина М. В. 61, 89, 117, 119
Чиркова В. Ю. 261
Чокморова У. З. 242
Чомахидзе П. Ш. 110
Чубаров А. С. 158, 160, 162
Чудинов А. В. 115
Чудинов И. К. 59
Чумачева Ю. В. 353
Шабурова Е. В. 354
Шайбекова Р. Р. 137
Шайдуллина Э. Р. 398
Шамаева Д. В. 168
Шамраева М. А. 355
Шамсутдинова О. А. 233
Шаньшин Д. В. 10, 38, 73, 16, 234
Шапрова О. Н. 216, 234
Шарабрин С. В. 31, 151, 357
Шаршов К. А. 240
Шастина Н. С. 105, 108, 133, 238
Швед Н. А. 21
Шевелева М. П. 275
Шевченко В. В. 215
Шевченко Н. Г. 238
Шекунов Е. В. 235
Шемякин Е. В. 240
Шемякин И. Г. 226
Шепетько М. Н. 361
Шершов В. Е. 132
Шестаков А. И. 101
Шестакова О. О. 101
Шестопалов А. В. 304
Шестопалов А. М. 231, 240
Шилин С. С. 186
Шилов Б. В. 338
Шимановский Н. Л. 271, 283
Шипелова А. В. 133
Шипулин Г. А. 213, 312, 331
Шипулина О. Ю. 214, 226
Шитик Е. М. 358
Шишацкая Е. И. 13
Шишкина Л. А. 226
Шишкина Л. Н. 220
Шишкова Д. К. 337
Шкарина А. Н. 12
Шкиль Н. Н. 139
Шкоденко Л. А. 384, 399
Шмелев М. Е. 21, 321
Шмурак В. И. 86
Шнейдер Ю. А. 211
Штатнова Д. Ю. 378
Штиль А. А. 379, 396
Шулинский Р. С. 380, 247
Шульгина И. С. 248
Шумаков Д. В. 161
Шурхай В. А. 320
Щаюк А. Н. 361
Щеглов Б. О. 400
Щеголева А. А. 272
Щелконогов В. А. 108, 133
Щелкунов С. Н. 245, 248
Щепеникова П. В. 359
Щербаков Д. Н. 10, 38–39, 55, 127, 216, 234, 261, 349, 386
Щербакова Н. С. 55, 349
Щербакова П. А. 101
Щербакова Ю. В. 60
Эйдельштейн М. В. 398
Юдкина А. В. 401
Юнусов Т. Ю. 186
Юрченко К. С. 231
Яббаров Н. Г. 61, 89, 117, 119
Якимов А. П. 135
Яковлева Е. И. 113
Яковлева К. И. 45
Якубицкий С. Н. 248
Ямашев М. В. 155, 165
Ямщиков П. С. 295, 367
Янцевич А. В. 333
Яньшина Т. М. 92
Яровая О. И. 55, 220, 349
Ясиновский М. И. 284
Ястребова Е. С. 142
Яхин И. Р. 107

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ

I

Архипов М. О. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ РАВНОВЕСНОЙ КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА «ДНК-ПОЛИМЕРАЗА — ОЛИГОНУКЛЕОТИД» ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОДНОВАЛЕНТНОЙ И ДВУХВАЛЕНТНОЙ СОЛЕЙ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИМЕРАЗ 3

Байкалов Г. И., **Бахарева К. И.**, **Князев Р. А.**, **Ершов К. И.**, **Мадонов П. Г.** ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗИРОВАННЫХ СУБТИЛИЗИНОВ НА ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАБОТЫ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА 5

Бакланов И. Н., **Гончаров Н. В.**, **Кумейко В. В.**, **Гулая В. С.** МОДИФИКАЦИЯ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МАРКИРОВАНИЯ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ IDH1 И TP53 6

Бахно И. А., **Довыденко И. С.** ДИЗАЙН И СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИНФОРМАЦИОННЫХ РНК 8

Баширзаде А. А., **Белова А. С.** **Сохейл Азизи**, **Бабченко В. Я.**, **Мыров В. О.** ИССЛЕДОВАНИЕ КОГНИТИВНОГО ПРОФИЛЯ DANIO RERIO ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЛАТФОРМЫ ПО СКРИНИНГУ НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ *IN VIVO* 9

Боргоякова М. Б., **Карпенко Л. И.** **Щербаков Д. Н.**, **Рудомётов А. П.** **Старостина Е. В.** **Шаньшин Д. В.**, **Исаева А. А.**, **Несмеянова В. С.** **Волкова Н. В.**, **Беленькая С. В.**, **Волосникова Е. А.** **Задорожный А. М.**, **Орлова Л. А.**, **Зайковская А. В.**, **Пьянков О. В.**, **Ильичёв А. А.** ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ ВАКЦИНОЙ «КОМБИКОРОНАВАК» ПРИВОДИТ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ СИЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-COV-2 10

Булгакова А. Е., **Дмитриенко Е. В.** ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ МАРКЕРОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО КНИ-БИОСЕНСОРА 11

Вишневский Д. А., **Гаранина А. С.**, **Науменко В. А.**, **Чернышева А. А.**, **Шкарина А. Н.**, **Малиновская Ю. А.**, **Семкина А. С.**, **Абакумов М. А.** ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С НЕЙТРОФИЛАМИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ НАНОПРЕПАРАТОВ 12

Владимирова А. В., **Шишацкая Е. И.** МИКРОЧАСТИЦЫ С КОМБИНИРОВАННЫМ АНТИСЕПТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ НА ОСНОВЕ ПГА-ПОЛИМЕРА ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ 13

Горбунова Е. А., **Епанчинцева А. В.**, **Пышная И. А.** ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ НЕСООТВЕТСТВИЯ, НА НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА 14

Григорьева Е. В., **Дмитриенко Е. В.** СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ КАК ОСНОВА ДЛЯ ТЕРАНОСТИКОВ 15

Дмитриева М. Е., **Переляева Е. В.**, **Моргунова М. М.**, **Белышенко А. Ю.**, **Тельнова Т. Ю.**, **Имидоева Н. А.**, **Аксёнов-Грибанов Д. В.** ОКСИФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ КАК ИСТОЧНИКИ АНТИОКСИДАНТОВ И НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ 16

Добрякова Н. В., **Жданов Д. Д.**, **Соколов Н. Н.**, **Кудряшова Е. В.** РАЗРАБОТКА КОНЪЮГАТОВ АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* С УЛУЧШЕННЫМИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ 17

Егорова А. Д., **Черных А. М.**, **Ренфельд Ж. В.**, **Коломыцева М. П.** ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ОКСИДАЗ ГРИБА *THIELAVIA OVISPORA*, СПОСОБНЫЕ ДЕГРАДИРОВАТЬ ПРОМЫШЛЕННЫЕ КРАСИТЕЛИ 18

Епанчинцева А. В., **Пышная И. А.**, **Пышный Д. В.** ВЛИЯНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК НА АФФИННОСТЬ ДНК К НАНОЧАСТИЦАМ ЗОЛОТА 19

Ерошин А. И., Идиятов И. И., Тремасова А. М. ОЦЕНКА АНТИМУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ 20
Жменя В. М., Гончаров Н. В., Гулая В. С., Шмелев М. Е., Швед Н. А., Пенькова А. О., Бакланов И. Н., Кумейко В. В. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ TP53 R248Q И IDH1 R132H В ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ГЛИОМ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9 21
Зилов Д. С., Очкалова С. Д., Комиссаров А. С. PANIMAN: ПРИЛОЖЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АННОТАЦИИ ГЕНОМОВ ЖИВОТНЫХ 23
Игнатов К. Б., Борисова М. А. Гаранин А. Ю., Анисименко М. С. Коваленко С. П. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В АНАЛИЗЕ ХРОМОСОМНЫХ АНЕУПЛОИДИЙ В КЛЕТКАХ ЭМБРИОНА ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ПРОЦЕДУРЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ 24
Илющенко В. В., Павлова А. С., Пышная И. А. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С АЛЬБУМИНАМИ 25
Кривкина Е. О. ОЦЕНКА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ, ГЕМОСОВМЕСТИМЫХ И АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПОКРЫТИЕМ 26
Кузубова Е. В., Мкртчян А. Ф., Круть У. А., Радченко А. И. АСИММЕТРИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИ ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ (*S*)-АЛАНИНА И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ 27
Кучур П. Д., Комиссаров А. С. GINOFIP-ПАЙПЛАЙН ДЛЯ ПОИСКА ОПЕРОНОВ С ГЕНАМИ ИНТЕРЕСА .. 28
Лазарев И. В. РАЗРАБОТКА МЕТОДА БИОМОЛЕКУЛЯРНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ С РЕЦЕПТОРНЫМИ БЕЛКАМИ GP17 ФАГА T7, GP12 ФАГА T4 И ФЛУОРОФИЛОМ β-ЛАКТАМАЗЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЭНДОТОКСИНОВ 29
Лебедева М. В., Таранов В. В., Комахин Р. А., Коновалова Л. Н., Иванова Л. А., Бабаков А. В., Злобин Н. Е. СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*S. tuberosum* L.) С НОКАУТ-МУТАЦИЕЙ ГЕНА *StLEAFY* С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 30
Литвинова В. Р., Шарабрин С. В., Рудомётов А. П., Карпенко Л. И., Ильичёв А. А. СИНТЕЗ мРНК, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА 31
Lunev E. A., Vassilieva S. G., Shmidt A. A., Egorova T. V., Bardina M. V. COMPARATIVE ANALYSIS OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS SEROTYPES FOR *IN VITRO* ASSESSMENT OF GNAO1 ENCEPHALOPATHY GENE THERAPY 32
Лунева О. В., Фатеев А. Д., Успенская М. В. СИНТЕЗ АКРИЛОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЖЕЛЕЗО-КООРДИНАЦИОННЫЕ СВЯЗИ 34
Магомбе Н., Антосюк О. Н., Болотник Е. В. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТА *PRUNELLA GRANDIFLORA* L. ОТНОСИТЕЛЬНО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ЭТОПОЗИД НА ПРИМЕРЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER* *35*
Медетова Г. М. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПОКРЫТИЙ С ФУНКЦИЕЙ ДЕПО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ 37
Меркульева Ю. А., Шаньшин Д. В., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА (RBD) S-БЕЛКА SARS-COV-2 В КЛЕТКАХ *E. COLI* *38*
Назаров К. Д., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКИ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ 3CL SARS-COV-2 В СИСТЕМЕ *E. COLI* *39*
Назарова А. А., Гурков А. Н., Дроздова П. Б., Тимофеев М. А. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЛЕНИЯ ГЕМОЦИТОВ И ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ 40
Николаева В. А., Зухайб М., Павлов Р. В., Гайнанова Г. А., Гарифуллин Р. И., Абдуллин Т. И. ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОСОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕПТИДАМИ RGD И GHK, В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ 41
Николайчук К. М., Федотова М. С., Горчакова О. В. ЛИМФОТРОПНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПРИ СТАРЕНИИ 42
Osetrov K. O., Uspenskaya M. V. STUDY ON THE INFLUENCE OF SODIUM LAURYL SULFATE ON GELATIN-TANNIN HYDROGELS 43
Pakhomova K. A., Kirillov B. A., Pasko A. A., I. Sh. Akhatov. MODELING OF DIFFUSION PROCESSES IN 3D BIOPRINTED TISSUES WITH FUNCTIONAL REPRESENTATIONS AND FINITE ELEMENT METHOD 44
Переверзев И. М., Яковлева К. И., Кечин А. А., Довыденко И. С. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЧНОСТИ СИНТЕЗА ДНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ 45

Переляева Е. В., Краснова М. Е., Имидоева Н. А., Моргунова М. М., Белышенко А. Ю., Тельнова Т. Ю., Аксенов-Грибанов Д. В. ШТАММ *STREPTOMYCES* SP. IB2019K190-4, КУЛЬТИВИРОВАННЫЙ НА СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ ОТХОДЫ ЛЕСОПИЛЕНИЯ, КАК ПРОДУЦЕНТ ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ *GLACIAPYRROL B*..... 46
Петухова Т. Е. ПЕРОРАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ЭРИТРОПОЭТИНА..... 47
Попова В. К., Ломзов А. А., Дмитриенко Е. В. ДИЗАЙН МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОТИВОРАКОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КОМПОЗИТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ..... 48
Попыванов Д. В. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МИЦЕЛИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ..... 49
Пурвиньш Л. В., Ситникова А. И., Седых С. Е. ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКЗОСОМ МОЛОКА ЛОШАДИ — ПЕРСПЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ..... 51
Пушкарев И. А., Афанасьева А. И. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ТЕЛОК ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ В ВОЗРАСТЕ 12 МЕСЯЦЕВ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕВОГО БИОСТИМУЛЯТОРА..... 52
Ренфельд Ж. В., Черных А. М., Мясоедова Н. М., Егорова А. Д., Гайдина А. С., Баскунов Б. П., Коломыцева М. П. НОВЫЕ ЛАККАЗЫ АСКОМИЦЕТОВ, АКТИВНЫЕ В НЕЙТРАЛЬНО-ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЕ..... 54
Рудометова Н. Б., Щербакова Н. С., Фандо А. А., Щербаков Д. Н., Соколова А. С., Яровая О. И., Салахутдинов Н. Ф., Карпенко Л. И. СОЗДАНИЕ АКТУАЛЬНОЙ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ, И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОИСКА СОЕДИНЕНИЙ, СПОСОБНЫХ БЛОКИРОВАТЬ ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИЧ-1 В КЛЕТКУ-МИШЕНЬ..... 55
Рябиков В. В., Тимирбаева Я. Д., Сергеенков С. В., Мысин М. А. АНАЛИЗ И ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСТРУКТУР СЕРЕБРА КАК МЕТОД БОРЬБЫ С МИКОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ..... 56
Саввина М. Т., Максимова Н. Р., Сухомясова А. Л., Данилова А. Л. РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ДНК-МИКРОЧИПА И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОГРАММАХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА В ЭТНИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ..... 58
Синицын С. О., Чудинов И. К. Сперанская А. С., Самойлов А. Е., Котов И. А., Хафизов К. Ф., Кинаш Н. А., Евстифеев Е. А., Быковский В. В., Остроушко А. А., Акимкин В. Г. РЕАЛИЗАЦИЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕДКИХ ГЕНОВАРИАНТОВ SARS-COV-2 НА ВСЕРОССИЙСКОЙ ПЛАТФОРМЕ VGARUS..... 59
Сиротина К. Ю., Щербакова Ю. В., Ахмадуллина Ф. Ю. МЕТОД БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ КАЧЕСТВА КОЗЬЕГО МОЛОКА ПРИ ЕГО ПАСТЕРИЗАЦИИ..... 60
Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Чиркина М. В., Балабаньян В. Ю., Никольская Е. Д. ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ И СТАНДАРТИЗАЦИИ НАНОРАЗМЕРНОЙ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА АДРЕСНОГО ДЕЙСТВИЯ..... 61
Соловьёва О. И., Завьялов Е. Л., Теплякова Т. В., Разумов И. А. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *DAEDALEOPSIS CONFRAGOSA* НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ *IN VITRO* И КСЕНОГРАФТЫ U87MG У МЫШЕЙ SCID..... 64
Солодков П. П. НАНОАНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ SARS-COV-2..... 65
Старостина Е. В., Каплина О. Н., Карпенко Л. И., Антонец Д. В., Марченко В. Ю., Бажан С. И. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ИСКУССТВЕННЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА..... 66
Столбунова К. А., Охлопкова О. В., Теплякова Т. В. БИОАКАРИЦИДЫ — РЕГУЛЯТОРЫ ЧИСЛЕННОСТИ ПЕРЕНОСЧИКОВ ТРАНСМИССИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА..... 67
Сульгин А. А., Иматдинов И. Р. САМОРЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ РНК (saRNA), КОДИРУЮЩИЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ..... 69
Токин Г. М. СОЗДАНИЕ КОНЦЕПЦИИ ПРОИЗВОДСТВА БИОСЕНСОРА НА ЭФФЕКТЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИМПРИНТИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ 3D-ПЕЧАТИ..... 71
Травникова Д. Ю., Акулина Е. А., Холина М. С., Белишев Н. В., Жаркова И. И., Сурменев Р. А., Сурменева М. А., Воинова В. В., Бонарцев А. П. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ В СОСТАВЕ ПЛЕНОК ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА НА РОСТ МСК..... 72

Ушкаленко Н. Д., Шаньшин Д. В. РАЗРАБОТКА ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ВНЕЛАБОРАТОРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ 4-ГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ... 73
Fedotkin A. Y., Maryin P. V. CALCIUM-PHOSPHATE COATINGS DOPED WITH NITRIC OXIDE FOR ORTHOPEDIC APPLICATIONS ... 74
Федотов К. А., Ода В. В., Водопьянов С. С., Зайчатникова К. И., Семкина А. С., Низамов Т. Р., Габашвили А. Н., Абакумов М. А. ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ МЕТКИ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ОТСЛЕЖИВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ ... 76
Филатова Т. А., Зернышкина А. А. ОСОБЕННОСТИ КИСЛОРОДНОГО РЕЖИМА ВОДЫ С ЖИВУЩЕЙ В НЕЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКОЙ ПРИ ЕЕ ВЫРАЩИВАНИИ В ИСКУССТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ ... 78
Ханова М. Ю. РАЗРАБОТКА ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЕННОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА МАЛОГО ДИАМЕТРА В УСЛОВИЯХ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НАПРЯЖЕНИЕМ СДВИГА ... 80
Харитонов Л. С. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИДЕОАНАЛИЗА В ИЗУЧЕНИИ ХАРАКТЕРА СОКРАЩЕНИЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ... 81
Хасанова А. А., Перушкина Е. В., Хабибуллина А. Р., Хафизова И. С., Сироткин А. С. О РОЛИ ФОСФАТАККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ... 84
Хасаншина З. Р., Корнаков И. А., Ищук С. А., Казакова А. В., Шмурак В. И., Латыпов В. Ф. РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ *E. COLI* ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЕПТИДОВ ... 86
Холдина А. М. ФЕРМЕНТАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНАЛОГОВ МОЛОКА МОЛОЧНОКИСЛЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ... 88
Чиркина М. В., Заварзина В. В., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Сокол М. Б., Никольская Е. Д. УЛУЧШЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И СИЛИБИНА ПУТЕМ ИХ ВКЛЮЧЕНИЯ В ПОЛИМЕРНУЮ НАНОРАЗМЕРНУЮ СИСТЕМУ ДОСТАВКИ ... 89
Яньшина Т. М., Сидорин А. В., Цыганков М. А., Румянцев А. М. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ МЕТИОНИНА В СРЕДЕ ... 92

II

Бабич О. О., Ларина В. В., Носкова С. Ю., Сухих С. А. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ ... 93
Бойко И. Ю. МЕТОД ВЫБОРА ЗНАЧИМЫХ ПРИЗНАКОВ ДЛЯ БИНАРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ДАННЫХ С ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ ... 94
Веснина А. Д. ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЕ ПИТАНИЕ — ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ МЕРОПРИЯТИЕ ПРОТИВ АТЕРОСКЛЕРОЗА ... 95
Ворошилин Р. А. МЕТОД ФЕРМЕНТАТИВНО-КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА КОСТНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ЖЕЛАТИНА ... 97
Вязов Е. В., Гончарик Р. Г. АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, ПРИ ОКИСЛЕНИИ *IN VITRO* ХЛОРОФИЛЛА *A* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ ФЕНТОНА ... 99
Гавирова Л. А., Щербакова П. А., Сережкин И. Н., Шестакова О. О., Исаченко А. И., Шестаков А. И. УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ МОРЕЙ АРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА ПРИ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ ... 101
Гасюк О. А., Волченко Н. Н., Лазукин А. А., Самков А. А., Худокормов А. А. БИОЭЛЕКТРОГЕНЕЗ ТВЕРДОФАЗНЫХ ГРУНТОВЫХ МТЭ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ЭЛЕКТРОДОВ ... 102
Гуцалова А. А. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ ... 104
Дарнотук Е. С., Моренко Е. О., Войтик К. Д., Пшеничникова А. Б., Шастина Н. С. ЛИПОФИЛЬНЫЕ ПРОЛЕКАРСТВА НА ОСНОВЕ 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-ТИАЦИТИДИНА ... 105
Дроздова М. Ю., Дышлюк Л. С. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ ИЗ *AMELANCHIER OVALIS* И *HIPPOPHAE RHAMNOIDES*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СИБИРИ, НА ФИТОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ПРОТИВОРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ... 106
Захаров З. В., Морозов А. Н., Яхин И. Р. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК *CHO*-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА В СООТВЕТСТВИИ С КОНЦЕПЦИЕЙ QUALITY BY DESIGN ... 107

Иншакова А. М., Щелконогов В. А., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Соловьёва Э. Ю., Федин А. И. СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ ГЛУТАТИОНА С α-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ 108
Камалов М. И., Николаева В. А., Павлюк А. М., Абдуллин Т. И. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АМФИПАТИЧЕСКИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ 109
Кузнецова Н. О., Гогниева Д. Г., Чомахидзе П. Ш., Копылов Ф. Ю. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА МЕТОДОМ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ОДНОКАНАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ 110
Лобанова Я. В. ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КСЕНОБИОТИКОВ 111
Малышева К. О., Яковлева Е. И. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *EISENIA ANDEI* С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ БИОХИМИЧЕСКОГО БИОМАРКЕРА 113
Мифтахов Р. А., Иконникова А. Ю., Чудинов А. В. ФОТОИНДУЦИРУЕМАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ 115
Моллаев М. Д., Никольская Е. Д., Заболотский А. И., Сокол М. Б., Моллаева М. Р., Чиркина М. В., Яббаров Н. Г. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО МУЛЬТИМЕРНОГО ПОЛИПЕПТИДА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА 117
Моллаева М. Р., Яббаров Н. Г., Сокол М. Б., Чиркина М. В., Каплун А. П., Никольская Е. Д. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ С ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНОМ 119
Нигматуллина Р. Т., Халиуллина А. М., Перушкина Е. В., Сафина А. М., Садыкова Д. Ф., Готлиб Е. М. АНАЛИЗ БИОДЕГРАДАЦИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ 121
Николаева А. А., Лутфуллина Г. Ф., Марданова А. М. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ МИКРОБИОТЫ СЛЕПОГО КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ 123
Rumyantceva V. I., Vinogradov V. V. AN APPROACH TO IMPROVING THE EFFICIENCY OF A BIOTECHNOLOGICAL PROCESS USING 3D STRUCTURES 124
Rumyantceva V. I., Koshel E. I. MAGNETICALLY CONTROLLED CERAMIC NANOCOMPOSITE AS AN AGENT FOR EFFECTIVE BIOFILMS ERADICATION 126
Северина В. А., Старожилова К. В., Щербаков Д. Н. ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ЛИПАЗЫ А *BACILLUS NATTO* В СИСТЕМЕ *BACILLUS SUBTILIS* С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЕКТОРА PBSU-LIPA 127
Селиванов П. А. СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА ОПЕРАЦИИ СВОБОДНОЙ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ 128
Солдатенко О. В., Карташев А. А. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВИН 129
Фотина Н. В., Дышлюк Л. С. ПРОБИОТИЧЕСКАЯ ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ *PROPIONIBACTERIUM JENSENII, PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* И LACTOBACILLUS *BIFERMENTANS* 131
Шершов В. Е., Кузнецова В. Е. ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-АПТАМЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ CELL SELEX К РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЕ C-KIT 132
Щелконогов В. А., Иншакова А. М., Дарнотук Е. С., Шипелова А. В., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Казаринов К. Д., Соловьёва Э. Ю., Федин А. И. НАНОДИСПЕРСИИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ 133

РАЗДЕЛ 2. БИОФИЗИКА

I

Алексеев А. А., Знобищева Е. А., Побегалов Г. Е., Якимов А. П., Байтин Д. М., Ходорковский М. А. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ RECA БЕЛКОМ RECX МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА 135
Бирулина Ю. Г., Буйко Е. Е., Григорьева А. В., Шайбекова Р. Р., Трубачева О. А. ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ 137
Боева О. С., Актанова А. А., Пашкина Е. А. ОЦЕНКА ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КУКУБИТУРИЛОВ И ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ 138

Валиулин С. В., Онищук А. А., Аньков С. В., Бакланов А. М., Дубцов С. Н., Толстикова Т. Г., Шкиль Н. Н. ИНГАЛЯЦИОННОЕ ВВЕДЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА ЦЕФАЗОЛИНА: ФАРМАКОКИНЕТИКА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ 139
Вигонт В. А., Грехнев Д. А., Казначеева Е. В. НАРУШЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ПРИЧИНЫ СЕЛЕКТИВНОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ 140
Волкова М. В., Бояринцев В. В., Трофименко А. В., Фильков Г. И., Дурыманов М. О. ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ 141
Гисич А. В., Ястребова Е. С., Строкотов Д. И. МОДЕЛИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЫ ЭРИТРОЦИТА В ПРОЦЕССЕ ВЕЗИКУЛЯРИЗАЦИИ 142
Демкин В. П., Руденко Т. В., Жуковская А. А., Котловская Л. Ю., Удут В. В. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СКОРОСТИ СДВИГА НА АГРЕГАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ 143
Дениева З. Г., Батищев О. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПОЗДНИХ СТАДИЙ ИНФИЦИРОВАНИЯ ОБОЛОЧЕЧНЫМИ ВИРУСАМИ 144
Добрынина Е. А., Окотруб К. А., Адищев С. В., Кручинина М. В., Кручинин В. Н., Суровцев С. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА 145
Зайцева Ю. В., Суровцев Н. В. ИССЛЕДОВАНИЕ МНОГОСЛОЙНЫХ ВЕЗИКУЛ ЛИПИДНЫХ СМЕСЕЙ МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА 146
Ishemgulov A. T., Letuta S. N. LASER ACTIVATION OF MOLECULAR SENSITIZERS FOR THE CONTROL OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA *IN SOLUTIONS* 148
Калниня Я. К., Подольская Е. П. ЛАБОРАТОРИЯ НА МИШЕНИ ДЛЯ СПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ АДДУКТОВ БЕЛКОВ КРОВИ С ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИМИ КСЕНОБИОТИКАМИ 149
Канарская М. А., Ломзов А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ТЕРМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПСЕВДОУЗЛА ДНК НОВОГО ТИПА 150
Кисаков Д. Н., Орлова Л. А., Шарабрин С. В., Рудометов А. П., Карпенко Л. И. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК- И РНК-ВАКЦИН МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ *IN VIVO* 151
Кононова П. А., Селютина О. Ю., Поляков Н. Э. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ГЛИЦИРРИЗИНА И ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА Е-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ 152
Коршунов А. С., Конев В. П., Вагнер В. Д., Рогачев Е. А., Курятников К. Н., Скурихина А. П., Бондарь А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ УПАКОВКИ И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЭМАЛЕВЫХ ПРИЗМ ЧЕЛОВЕКА ПРИ НАРУШЕННОМ АМЕЛОГЕНЕЗЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ 153
Мартышина А. В., Тилинова О. М., Кисиль С. И., Ямашев М. В., Докукина И. В., Грачев Е. А. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ГЕПАТОЦИТАХ 155
Mayakovskaya A. V., Volynets G. P. THE MUTANT VARIANT OF PAH GENE EX5DEL4232INS268 WHICH ENCODES THE HUMAN ENZYME PHENYLALANINHYDROXYLASE AND ITS IMPACT ON THE FUNCTIONS OF THIS ENZYME 156
Мельникова А. А., Балдов Д. А. ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ АДРОННОЙ ТЕРАПИИ ИОНАМИ 12C С ДОКСОРУБИЦИНОМ И ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ С ДОКСОРУБИЦИНОМ НА РАКОВЫЕ КЛЕТКИ ШЕЙКИ МАТКИ 157
Mitin D. E., Petrov K. D., Suvorov D. A., Chubarov A. S. ALBUMIN CONJUGATES AS MAGNETIC RESONANCE IMAGING CONTRAST AGENTS 158
Осик Н. А., Зеленцова Е. А., Центалович Ю. П. ОВОТИОЛ А: АНТИОКСИДАНТ И ФОТОПРОТЕКТОР 159
Petrov K. D., Mitin D. E., Suvorov D. A., Chubarov A. S. NITROXIDES AS A VERSATILE TOOL FOR REVERSIBLE PROTEIN AND PROTEIN-NUCLEIC ACIDS COMPLEXES INVESTIGATION 160
Романова С. Г., Фролова Ш. Р. Слотвицкий М. М., Бережной А. К., Цвелая В. А., Попов М. А., Шумаков Д. В., Зыбин Д. И., Агладзе К. И. ВЛИЯНИЕ КАРДИОПЛЕГИЧЕСКОГО РАСТВОРА «КУСТОДИОЛ» НА БЫСТРЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ 161
Санникова Н. Э., Тимофеев И. О., Чубаров А. С., Лебедева Н. Ш., Семейкин А. С., Кирилюк И. А., Центалович Ю. П., М. Боуман, **Федин М. В., Багрянская Е. Г., Крумкачева О. А.** ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С АЛЬБУМИНОМ МЕТОДАМИ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ 162

Северюхин Ю. С. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ ... 163
Сырямина В. Н., Де Дзотти М., Формаджо Ф., Дзюба С. А. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ: ФОРМИРОВАНИЕ КАНАЛОВ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ... 164
Тилинова О. М., Ямашев М. В., Докукина И. В., Грачев Е. А. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДИСФУНКЦИИ БЕТА-КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ... 165
Токальчик Д. П. ЭФФЕКТЫ ЛИГАНДОВ α2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ ГИППОКАМПА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИИ ... 166
Шамаева Д. В., Окотруб К. А., Суровцев Н. В. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОМАСШТАБНЫХ ДОМЕНОВ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КРС ... 168

II

Брус Т. В., Васильев А. Г., Пюрвеев С. С., Кравцова А. А., Балашов Л. Д. БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ ЖИРОВОЙ ДИСТРОФИИ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА ... 170
Ефремов Ю. М., Тимашев П. С. СУБСТРАТЫ С РЕГУЛИРУЕМЫМИ МЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНОЗАВИСИМОГО ПОВЕДЕНИЯ КЛЕТОК ... 172
Курьянчик Т. Г., Козел Н. В. МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ ... 173
Медведева Е. И., Самович Т. В., Козел Н. В. ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ ЦЕПИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО ... 175
Римская Б. А., Бережной А. К., Слотвицкий М. М., Цвелая В. А. МОДЕЛИРОВАНИЕ АНИЗОТРОПИИ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОСТИНФАРКТНОГО РУБЦА ... 177
Созарукова М. М., Савинова Е. А., Проскурнина Е. В. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЗОЛЕЙ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БИОСОВМЕСТИМЫМИ ЛИГАНДАМИ ... 180
Суховеева С. В., Кабачевская Е. М. РАЗВИТИЕ ГРАВИТРОПИЧЕСКИХ И НАСТИЧЕСКИХ ДВИЖЕНИЙ В НАДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ ПРОРОСТКОВ ТОМАТА ... 181
Тюлина В. В., Милаёва И. В., Царькова М. С. МОЛОЗИВО И МОЛОКО КОЗ: БИОХИМИЧЕСКИЕ И КОЛЛОИДНЫЕ СВОЙСТВА ... 183
Харьковская Е. Е., Осипов Г. В., Мухина И. В. МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО РАСТЯЖЕНИЯ НА ФОНЕ ГИПОКСИИ ... 184
Цибулина А. О., Демкин В. П., Удут В. В., Руденко Т. В. ВЛИЯНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ КРОВИ НА ПЛАЗМЕННЫЙ ГЕМОСТАЗ ... 185
Шилин С. С., Костяева М. Г., Кастыро И. В., Юнусов Т. Ю., Коломин Т. А., Торшин В. И., Попадюк В. И., Драгунова С. Г., Клейман В. К., Кузнецов Н. Д., Сломинский П. А. ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА p53 ОТ ПОЯВЛЕНИЯ ТЕМНЫХ НЕЙРОНОВ В ГИППОКАМПЕ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ СЕПТОПЛАСТИКИ ... 186

РАЗДЕЛ 3. ВИРУСОЛОГИЯ

I

Бабошко Д. А., Осипова И. П., Екушов В. Е., Кузьмин А. И., Рожков О. А., Тотменин А. В., Флеер М. В., Гашникова Н. М. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫДЕЛЕННЫХ В ЧАСТНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ И КРУПНОМ ЖИВОТНОВОДЧЕСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ ... 188
Бадриева П. М., Адиева А. А., Абакаров Г. М., Бекшоков К. С., Меджидов М. А., Меджидова М. Г. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТЕЛЛУРСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ... 190

Бочкарева М. Д., Иматдинов И. Р. МОДЕЛЬ ТАРГЕТНОГО ВИРОЛИЗИСА ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК 193
Гаптулбарова К. А., Родионов Е. О., Ибрагимова М. К., Долгашева Д. С., Цыденова И. А., Цыганов М. М. ЗНАЧЕНИЕ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРОГНОЗЕ БЕЗМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО 194
Гладышева А. А., Гладышева А. В., Терновой В. А., Локтев В. Б. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР 5'-3' UTRS НОВОГО МНОГОКОМПОНЕНТНОГО ВИРУСА KINDIA TICK VIRUS 196
Деулин И. Ю., Хрипко Ю. И., Помулев В. А., Хрипко О. П. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИРКУЛЯЦИИ СЕЗОННЫХ КОРОНАВИРУСОВ И ИХ ПЕРЕСЕЧЕНИЯ С НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ COVID-19 В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ 198
Забелина Д. С., Гражданцева А. А., Кочнева Г. В., Куцейкин С. С., Осипов И. Д., Романенко М. В., Сизова М. А., Нетёсов С. В. НОВЫЙ ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ШТАММ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА 6 СЕРОТИПА В ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ И РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 200
Здерева Е. А., Ибрагимова М. К. ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ *IN SITU* 201
Ивкина Д. И., Иматдинов И. Р. МИНИГЕНОМНАЯ РЕПОРТЕРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО СЕГМЕНТА *S* ГЕНОМА ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ 203
Карпова Е. В., Колпакова Е. С. Ословский В. Е., Осолодкин Д. И., Козловская Л. И. *IN VITRO* СКРИНИНГ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ ЭНТЕРОВИРУСА A71 205
Кихтенко Н. А., Мадонов П. Г., Фурсова А. Ж., Ильичёва Т. Н., Дурыманов А. Г. ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЭГИЛИРОВАННОГО ИНТЕРФЕРОНА ЛЯМБДА ПРИ АДЕНОВИРУСНОМ ПОРАЖЕНИИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА 206
Колпакова Е. С., Карпова Е. В. Барашкова А. С., Рогожин Е. А., Козловская Л. И. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЭКСТРАКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ (SARS-CoV-2 И ЧИКУНГУНЬЯ) 208
Кольцов А. Ю., Кольцова Г. С. БЕЛКИ CD2V И ЛЕКТИН ОБУСЛАВЛИВАЮТ СЕРОЛОГИЧЕСКУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСА АЧС 209
Кольцова Г. С., Крутько С. А., Белов С. В., Коротин А. В., Сухер М. М., Кольцов А. Ю. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУЛЕНТНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА АЧС С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА EP402R 210
Лопаткин А. А., Шнейдер Ю. А., Живаева Т. С., Хорина Н. А. ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА КАРЛИКОВОЙ МОЗАИКИ КУКУРУЗЫ (MAIZE DWARF MOSAIC VIRUS) МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ 211
Матвеев А. Л., Козлова И. В., Емельянова Л. А., Хлусевич Я. А., Байков И. К., Тикунова Н. В. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ АНТИТЕЛА НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *IN VIVO*, НО НЕ *IN VITRO* 212
Мацвай А. Д., Айгинин А. А., Михайлов И. М., Сай А. В., Хафизов К. Ф., Шипулин Г. А. РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО АЛГОРИТМА СОЗДАНИЯ МУЛЬТИПРАЙМЕРНЫХ ПАНЕЛЕЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ШИРОКОГО СПЕКТРА ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 213
Надтока М. И., Селезов С. Ю., Акимкин В. Г., Сперанская А. С., Черкашина А. С., Каптелова В. В., Самойлов А. Е., Саенко С. С., Синицын С. О., Корнеенко Е. В., Хафизов К. Ф., Котов И. А., Дудорова А. В., Голубева А. Г., Зотова М. И., Берлина Ю. Ю., Соловьёва Е. Д., Валдохина А. В., Буланенко В. П., Шипулина О. Ю., Кондрашева Л. Ю., Дубоделов Д. В. ВКЛАД РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОВАРИАНТОВ SARS-COV-2 В ПОДЪЕМ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 ЗИМОЙ 2020–2021 В РФ 214
Налимова Т. М., Екушов В. А., Шевченко В. В., Ильина Е. А., Тотменин А. В., Гашникова Н. М. АНАЛИЗ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИТЕЛЕЙ АЛТАЙСКОГО КРАЯ, С ВЫЯВЛЕННОЙ НЕЭФФЕКТИВНОСТЬЮ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ 215
Никитин А. О., Шапрова О. Н., Колосова Е. А., Шаньшин Д. В., Ельчанинова С. А., Щербаков Д. Н. ОЦЕНКА ИММУННОГО ОТВЕТА У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ COVID-19 С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ БОЛЕЗНИ И ДИАГНОСТИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ 216

Овчинникова Е. О., Хрипко О. П., Хрипко Ю. И., Деулин И. Ю. СРАВНЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ НА COVID-19 В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ 217
Орешко В. В., **Ковалева К. С., Бормотов Н. И., Шишкина Л. Н., Борисевич С. С., Яровая О. И., Салахутдинов Н. Ф.** СИНТЕЗ S, N-ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ КАМФОРНЫЙ ФРАГМЕНТ, И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ 220
Помулев В. А., Хрипко О. П., Деулин И. Ю., Хрипко Ю. И. АНАЛИЗ ПРОЦЕНТА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ COVID-19 В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СЕЗОНА 221
Примакова Е. О., Овчинникова Е. О., Деулин И. Ю., Хрипко Ю. И., Хрипко О. П. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ SARS-CoV-2 223
Проценко М. А., Филиппова Е. И., Теплякова Т. В., Серова О. А., Мазуркова Н. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАЗИДИОМИЦЕТА ТРУТОВИКА НАСТОЯЩЕГО *FOMES FOMENTARIUS* 224
Пятавина Л. А., **Иматдинов И. Р.** КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РИНОВИРУСА A28 ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ КСЕНОАНТИГЕНОВ 225
Смирнова Ю. С., Роев Г. В., Акимкин В. Г., Сперанская А. С., Комиссаров А. Б., Лиознов Д. А., Богун А. Г., Дятлов И. А., Храмов М. В., Самойлов А. Е., Надтока М. И., Селезов С. Ю., Синицын С. О., Корнеенко Е. В., Черкашина А. С., Хафизов К. Ф., Борисова Н. И., Каптелова В. В., Саенко С. С., Голубева А. Г., Зотова М. И., Берлина Ю. Ю., Соловьёва Е. Д., Валдохина А. В., Буланенко В. П., Шипулина О. Ю., Кондрашева Л. Ю., Дубоделов Д. В., Шемякин И. Г., Соломенцев В. И., Сизова А. А., Шишкина Л. А., Кисличкина А. А., Лебедева А. Ю., Курилова А. Е., Скрябин Ю. П., Благодатских С. А. РАСПРОСТРАНЕНИЕ DELTA-ВАРИАНТА SARS-CoV-2 И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В МОСКВЕ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ 226
Сульгина Т. В., Иматдинов И. Р. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС КОРИ КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН 228
Тишин А. Е., Иматдинов И. Р. Минигеномная система вируса Пуумала 230
Филиппова А. Ю., Федотова М. С., Юрченко К. С., Гуляева М. А., Шестопалов А. М. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ КОТЯТ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ SARS-COV-2 231
Хлусевич Я. А., Матвеев А. Л., Емельянова Л. А., Голота О. В., Тикунова Н. В. ЭПИТОПНАЯ СТРУКТУРА РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА P35 ОРТОПОКСВИРУСОВ 232
Шамсутдинова О. А., Лаврентьева И. Н., Карал-оглы Д. Д. ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ МЕТОДА ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ОСТАТОЧНОЙ НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТИ НИЗКОАТТЕНУИРОВАННОГО И ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ 233
Шапрова О. Н., Колосова Е. А., **Шаньшин Д. В., Щербаков Д. Н.**, **Ильичёва Т. Н.** РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ SARS-COV-2 И ВЫЯВЛЕНИЕ КРОССРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ 234
Шекунов Е. В., Ефимова С. С., Остроумова О. С. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ВИРУСНОГО СЛИЯНИЯ 235

II

Alexyuk M. S., Moldakhanov Y. S., Akanova K. S., Anarkulova E. I. VIROME ANALYSIS OF SURFACE WATERS OF THE ARTIFICIAL RESERVOIR IN CENTRAL ASIA 236
Асташонок А. Н., Полещук Н. Н. НАНОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕТА-АМЛОИДОВ ПРИ БОЛЕЗНИ КРЕЙТЦФЕЛЬДАТА — ЯКОБА 237
Белявцев А. Н., **Шастина Н. С., Колесанова Е. Ф., Мельникова М. В., Вахренев Р. Г., Шевченко Н. Г., Сапронов Г. В., Николаева Л. И.** СИНТЕЗ И АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ 24-ПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭПИТОПЫ НЕСТРУКТУРНОГО АНТИГЕНА NS4A ВИРУСА ГЕПАТИТА С 238
Budkina A. Y., **Korneenko E. V., Kotov I. A., Khafizov K., Akimkin V. G.** DETECTING VIRAL READS IN BAT METAGENOMIC SEQUENCING DATA WITH VIRIDAL BIOINFORMATIC PIPELINE 239
Дёрко А. А., Дубовицкий Н. А., Манеева Е. П., Мурашкина Т. А., Глущенко А. В., Шемякин Е. В., Хаснатинов М. А., Шестопалов А. М., Шаршов К. А. АНАЛИЗ ЛЕНТОГЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА У ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ 240

Екушов В. Е., Сивай М. В., Тотменин А. В., Ивлев В. В., Осипова И. П., Зырянова Д. П., Налимова Т. М., Гашникова М. П., Чокморова У. З., Моторов У. Т., Акматова Ж. К., Асыбалиева Н. А., Нарматова Э. Б., Бекболотов А. А., Кадырбеков У. К., Максютов Р. А., Гашникова Н. М. АНАЛИЗ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИЧ-1 К АНТИРЕТРОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ НА ТЕРРИТОРИИ КИРГИЗИИ 242
Есьман А. С., Саламайкина С. А., Сперанская А. С., Черкашина А. С., Миронов К. О. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ШТАММОВ ВИРУСА SARS-COV-2 243
Kaptelova V. V., Kotov I. A., Borisova N. I., Kolesnikov A. A., Marakulina D. A., Budkina A. Y., Khafizov K., Akimkin V. G. EFFICIENT MONITORING OF THE SPREAD OF SARS-COV-2 VARIANTS BY TARGETED HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING 244
Коняхина Ю. В., Титова К. А., Сергеев А. А., Щелкунов С. Н. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ МЫШЕЙ И ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ СКРИНИНГОВОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ 245
Корнеенко Е. В., Самойлов А. Е., Артюшин И. В., Дедков В. Г., Смирнова Ю. С., Надтока М. И., Сперанская А. С. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОГО ГЕНОМА НОВОГО MERS-COV-ПОДОБНОГО БЕТАКОРОНАВИРУСА ИЗ ПОМЕТА *PIPPISTRELLUS NATHUSII* ИЗ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ 246
Семенова А. В., Сиволобова Г. Ф., Гражданцева А. А., Пьянков С. А., Шульгина И. С., Кочнева Г. В. ВАКЦИННАЯ КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА MVA ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСА ЭБОЛА 247
Сергеев А. А., Якубицкий С. Н., Титова К. А., Старостина Е. В., Боргоякова М. Б., Задорожный А. М., Кисаков Д. Н., Шульгина И. С., Пьянков С. А., Колосова И. В., Карпенко Л. И., Щелкунов С. Н. АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ИНФЕКЦИЮ BALB/C МЫШЕЙ ШТАММОМ LIVP ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ 248
Ситникова А. И., Тимофеева А. М., Максименко Л. В., Седых С. Е. АНАЛИЗ БИСПЕЦИФИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ 249
Sobko O. A., Matsishina N. V., Fisenko P. V., Kim I. V. ASSESSMENT OF THE INFECTIOUS LOAD IN THE POTATO FIELD AGROECOSYSTEM AND ITS MANIFESTATIONS 250
Тимофеева А. М., Котова О. Н., Седых С. Е. ПОЛИРЕАКТИВНОСТЬ И ПЕРЕКРЕСТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ ПРОТИВ S-БЕЛКА SARS-COV-2 У ПЕРЕБОЛЕВШИХ И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДОНОРОВ 252

РАЗДЕЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

I

Nour M. A. Y., Wanjohi J., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. DISTINGUISHING HIGH FROM LOW CONCENTRATIONS OF RNA CANCER MARKER: 5-INPUT BINARY DEOXYRIBOZYME THRESHOLDING GATE 253
Адонина С. Н., Базовкина Д. В. ВЛИЯНИЕ КОРОТКОГО СВЕТОВОГО ДНЯ НА ПОВЕДЕНИЕ И СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА У ЛИНИЙ МЫШЕЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К КАТАЛЕПСИИ 255
Andriianova A. I., Nedorezova D. D., Andriyanov V. S., Kolpashchikov D. M. SPLIT DEOXYRIBOZYME (DZ) MACHINES FOR CLEAVAGE OF FOLDED RNA TARGETS 256
Ахметова А. Ж., Акильжанова А. Р. Кожамкулов У. А. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *M. TUBERCULOSIS* СРЕДИ НОВЫХ СЛУЧАЕВ В КАЗАХСТАНЕ 258
Ахметова Д. А., Конончук В. В. AhR-РЕГУЛИРУЕМЫЕ И PD-L1-РЕГУЛИРУЮЩИЕ МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО 259
Бауэр И. А., Дмитриенко Е. В. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОВАЛЕНТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ 260
Беленькая С. В., Чиркова В. Ю., Щербаков Д. Н. ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ОСНОВНОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ПРОТЕАЗЫ 3CL 261
Белокопытова И. И., Кондаурова Е. М., Куликова Е. А., Ильчибаева Т. В., Науменко В. С. ЭФФЕКТ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА CC2D1A В ГИППОКАМПЕ НА ПОВЕДЕНИЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ BTBR — МОДЕЛИ АУТИСТИКОПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ 262

Берсенева А. А., Комарова Л. Н. ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ОЖИРЕНИЯ У СТУДЕНТОВ РАЗНЫХ НАЦИОНАЛЬНОСТЕЙ 263
Biryukov M. Yu., Dmitrieva A. M., Bazarova E. L., Ustyantsev K. V., Berezikov E. V. IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN THE PROCESS OF STEM CELL DIFFERENTIATION INTO MUSCLE CELLS IN THE FREE-LIVING FLATWORM MACROSTOMUM LIGNANO 265
Boyko A. V., Dolmatov I. Yu. THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTORS IN TRANSDIFFERENTIATION DURING REGENERATION IN SEA CUCUMBERS 266
Будячок О. В., Цыденова И. А., Цыганов М. М., Маркович В. А., Ибрагимова М. К., Долгашева Д. С., Гаптулбарова К. А., Тузиков С. А., Литвяков Н. В. МЕЖСАЙТОВАЯ ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА 267
Буслаев В. Ю., Винокуров М. А. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОМА МОКРОТЫ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПОДТИПАМИ РАКА ЛЕГКОГО 269
Волковинская П. А., Степанова Д. С., Браун Л. А., Дьячкова А. А., Куликов Ф. В., Варпетян Э. Э., Шимановский Н. Л. ПОИСК ПОДХОДОВ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОФИБРОМАТОЗОВ НА ОСНОВАНИИ ПЕРЕСТРОЙКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 1 И 2 ТИПА 271
Геращенко Т. С., Хозяинова А. А., Воробьев Р. С., Щеголева А. А., Родионов Е. О., Киселев А. М., Артемов Н. Н., Панкова О. В., Перельмутер В. М., Денисов Е. В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕРМИНАЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО 272
Головенчик В. И., Гайдученко Е. С., Липинская Т. П. ВЕКТОР РАСПРОСТРАНЕНИЯ БЫЧКА-ПЕСОЧНИКА (*NEOGOBIUS FLUVIATILIS* (PALLAS, 1814)) В БЕЛОРУССКУЮ ЧАСТЬ ЦЕНТРАЛЬНОГО ИНВАЗИОННОГО КОРИДОРА НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ 273
Григорьева Ю. Д., Кондаурова Е. М., Ильчибаева Т. В., Еремин Д. В., Базовкина Д. В., Науменко В. С. НОКДАУН ГЕНА *CC2D1A* В ГИППОКАМПЕ: ЭФФЕКТ НА ПОВЕДЕНИЕ И СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ ASC (ANTIDEPRESSANTS SENSITIVE CATALEPSY) С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ 274
Дерюшева Е. И., Литус Е. А., Немашкалова Е. Л., Шевелева М. П., Пермяков С. Е. СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ СЫВОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, МОДУЛИРУЮЩИХ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСВИЕ С Aβ-ПЕПТИДОМ, В ЦЕЛЯХ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА 275
Drozd V. S., Nedorezova D. D., Smirnov V. V., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. BINARY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR ONCOMARKER-DEPENDENT TARGET RNA DEGRADATION 276
Дронова Т. А., Бабышкина Н. Н., Слонимская Е. М., Чердынцева Н. В. ИЗУЧЕНИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ И ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНОЙ ЗНАЧИМОСТИ TGFβ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ У ПАЦИЕНТОК С ДИАГНОЗОМ ER-ПОЗИТИВНЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧАВШИХ ТАМОКСИФЕН 277
Dubovichenko M. V., Bobkov G. A., Batsa M., Kolpashchikov D. M. RNA-CLEAVING BIVALENT DNA-DEVICES FOR INHIBITION OF GENE EXPRESSION 279
Дуденкова А. С., Комарова Л. Н., Ляпунова Е. Р. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ПОЛИМЕРНЫМИ И ТИТАНОВЫМИ МАТЕРИАЛАМИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТОВ 281
Дьячкова А. А., Степанова Д. С., Браун Л. А., Волковинская П. А., Куликов Ф. В., Варпетян Э. Э., Шимановский Н. Л. АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 283
Жегло Д. Г., Пожитнова В. О., Адильгереева Э. П., Фефелова Е. И., Кислова А. В. Устинов К. Д., Ясиновский М. И., Воронина Е. С. ИЗУЧЕНИЕ ЛОМКОСТИ ХРОМОСОМ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА 284
Захарова К. С., Анискина А. И., Филонов Д. О., Суворова А. О. ИММОБИЛИЗАЦИЯ Taq-ПОЛИМЕРАЗЫ и MMLV ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОДНОСТАДИЙНОЙ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ЦЕЛЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК-СОДЕРЖАЩЕГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ (ALPHAINFLUENZAVIRUS) 286
Земерова Т. П., Рубель М. С., Колпащиков Д. М. РАЗРАБОТКА ДНК-КАССЕТЫ НА ОСНОВЕ БИНАРНОГО ДЕЗОКСИРИБОЗИМА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ФОНОВОГО СИГНАЛА ПРИ ДЕТЕКЦИИ АНАЛИТОВ 288

Зенина А. Д., Григорьева Т. А. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЛИНИИ НСТ116 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МТТ-ТЕСТА 289
Зинченко Н. Д., Савиновская Ю. И., Ермаков М. С., Нуштаева А. А., Кулигина Е. В., Семенов Д. В. МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ НЕК293 ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ АНАЛОГОВ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК GAS5 290
Ибрагимова М. К., Долгашева Д. С., Цыганов М. М., Литвяков Н. В. ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С АМПЛИФИКАЦИЕЙ ДЛИННОГО ПЛЕЧА 8 ХРОМОСОМЫ 291
Ибрагимова М. К., Цыденова И. А. Цыганов М. М., Литвяков Н. В. ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ: СВЯЗЬ С ГЕМАТОГЕННЫМ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ 293
Казакова А. Д., Ямщиков П. С., Патышева М. Р., Казакова Е. О., Ракина М. А., Афанасьев С. Г., Тарасова А. С., Ларионова И. В., Кжышковска Ю. Г. ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ДЛЯ ПОИСКА ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ 295
Каманова Е. П., Старчевская М. Е., Непомнящих Т. С., Антонец Д. В. МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ НАСЕКОМЫХ СЕМЕЙСТВА SIMULIIDAE И CERATOPOGOIDAE 296
Капущак Я. К., Запарина О. Г., Пахарукова М. Ю., Мордвинов В. А. ГЕПАТОБИЛИАРНАЯ ИНФЕКЦИЯ, ВЫЗЫВАЕМАЯ ПАРАЗИТИРОВАНИЕМ OPISTHORHIS FELINEUS, ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ ПОЧЕЧНОЙ ПАТОЛОГИИ, УСИЛИВАЮЩЕЙСЯ В ДИНАМИКЕ ИНФЕКЦИИ 297
Кокшарова Г. С. ИНДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ НАР1 298
Kolosova O. S., Drozd V. S., Smirnov V. V., Kalnin A. I., Kolpashchikov D. M. DEVELOPMENT OF «AND-GATE» LOGIC ELEMENT BASED ON BINARY DEOXYRIBOZYME 299
Лахова Т. Н., Ощепков Д. Ю., Мухин А. М., Лашин С. А. ПОСТРОЕНИЕ СЕТЕЙ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ГЕНОМНОЙ ИНФОРМАЦИИ 301
Mamontova E. M., Sukhanova M. V., Joshi V., Lavrik O. I., Pastré D. MICROTUBULE BENCH AS A PLATFORM TO PROBE INTERACTIONS BETWEEN DNA REPAIR FACTORS AND FUS IN CELLS 302
Маркелова М. И., Хуснутдинова Д. Р., Лайков А. В., Сенина А. М., Абдулхаков С. Р., Григорьева Т. В., Шестопалов А. В. ВЗАИМОСВЯЗЬ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА С АДИПОЦИТОКИНАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ 304
Махалова К. И., Семиколенова О. А. Мещанинова М. И., Новопашина Д. С. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ДОСТАВКЕ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 305
Мачулин А. В., Гришин С. Ю., Джус У. Ф., Сурин А. К., Галзитская О. В. ИЗУЧЕНИЕ ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДОГЕННЫХ УЧАСТКОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S1 В ЦЕЛЯХ СОЗДАНИЯ НОВЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ НА ОСНОВЕ НАПРАВЛЕННОЙ БЕЛКОВОЙ АГРЕГАЦИИ 307
Машков Е. И., Гайдученко Е. С., Крищук И. А. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (ПЦР-ТИПИРОВАНИЕ) ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ ОБЫКНОВЕННОЙ ПОЛЕВКИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ БЕЛАРУСИ 308
Меламуд М. М., Бунева В. Н., Ермаков Е. А. ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ 310
Михайлов И. М., Мурашкина А. А., Киселев В. В., Ахальцева Л. В., Ингель Ф. И., Никитина Т. А., Коняшкина М. А., Шипулин Г. А. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ИНДУКЦИИ МИКРОЯДЕР, ХРОМОСОМНЫХ МОСТОВ И АПОПТОЗА НА ОСНОВЕ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ 312
Можаровская Л. В. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PR-1 PINUS SYLVESTRIS 313
Недорезова Д. Д., Васильева Т. В., Колпащиков Д. М. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АНТИСМЫСЛОВОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА В КЛЕТКАХ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА 315
Нестерко Е. Э., Дятлова А. С. РЕАКЦИЯ ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА НА ВВЕДЕНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА-В ПОСЛЕ СЕЛЕКТИВНОЙ СУБДИАФРАГМАЛЬНОЙ ВАГОТОМИИ 316

Орлова Л. А., Кисаков Д. Н., Литвинова В. Р., Фандо А. А., Рудометов А. П., Карпенко Л. И. СИНТЕЗ МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ БЕЛОК GFP, И ДОСТАВКА МРНК С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ 318
Патрикеев А. Д., Гусев Ф. Е., Григоренко А. П., Рогаев Е. И. ЭВОЛЮЦИЯ СЕМЕЙСТВ ГЕНОВ У МЕДУЗ *AURELIA SPP.* И ИХ РОЛЬ В ОНТОГЕНЕЗЕ 319
Пеков С. И., **Сорокин А. А., Кузин А. А., Бормотов Д. С., Заворотнюк Д. С., Шурхай В. А., Попов И. А.** ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИПИДНОГО ПРОФИЛЯ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ВЫСШЕЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ 320
Пенькова А. О., Гончаров Н. В., Шмелев М. Е., Жменя В. М., Бакланов И. Н., Гулая В. С., Кумейко В. В. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TP53 И MDM2 В ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ГЛИОМ 321
Плотникова М. Ю., Григоренко А. П., Ерофеева Т. В., Гусев Ф. Е., Дудко Н. А., Патрикеев А. Д., Мостовщикова П. С., Косевич И. А., Рогаев Е. И. ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ УШАСТОЙ МЕДУЗЫ *AURELIA SPP* *323*
Полякова А. А. МЕТОД КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ В РЕАЛИЗАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ЗАДАЧ: ОЦЕНКА ПРИЖИВАЕМОСТИ ИМПЛАНТОВ У ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ 324
Прохоров О. Б., Конончук В. В., Копейкина Е. В., Калинина Т. С. ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДАМИ *IN SILICO* 325
Родный А. Я., Ильчибаева Т. В., Куликова Е. А., Базовкина Д. В., Науменко В. С. СВЕРХЭКСПРЕССИЯ 5-НТ7 РЕЦЕПТОРА В ОБЛАСТИ ЯДЕР ШВА ОКАЗЫВАЕТ АНТИДЕПРЕССИВНЫЙ ЭФФЕКТ И ВЛИЯЕТ НА СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА У МЫШЕЙ 326
Рудомётов А. П., Рудомётова Н. Б., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. ПОЛИЭПИТОПНЫЕ ИММУНОГЕНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КОМБИНАЦИИ ИЗВЕСТНЫХ ЭПИТОПОВ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ВИЧ-1 АНТИТЕЛ 327
Ряховский С. С., **Очкалова С. Д. Рысков А. П., Комиссаров А. С.** *DE NOVO* СБОРКА И АННОТАЦИЯ ТРАНСКРИПТОМОВ ТРЕХ ВИДОВ ЯЩЕРИЦ *DAREVSKIA,* ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЙ *D. UNISEXUALIS* И ДВУПОЛЫХ *D. VALENTINI* & *D. RADDEI NAIRENSIS* 328
Савинкова М. М., **Ермаков М. С. Рихтер В. А., Коваль О. А.**, **Нуштаева А. А.** ГЕТЕРОГЕННЫЕ 3D-2 КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 329
Савостьянова Т. А., **Назаркина Ж. К., Челобанов Б. П., Лактионов П. П.** ПОЛИМЕРНЫЕ 3D-МАТРИКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УГЛЕРОДНЫЕ ЧАСТИЦЫ, В КАЧЕСТВЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОКРЫТИЯ ДЛЯ СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ 330
Сай А. В., Мацвай А. Д., Михайлов И. М., Киселев Д. А., Айгинин А. А., Гордукова М. А., Галеева Е. В., Шипулин Г. А. ВЫЯВЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 331
Саковина Л. В., Вохтанцев И. П., Новопашина Д. С. 2'-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК КАК КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 332
Саченко А. Б., Диченко Я. В., Янцевич А. В. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БЕЛКА СЛИЯНИЯ ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ БЫКА И ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ *SULFOLOBUS SOLFATARICUS* *333*
Серяпина А. А., Редина О. Е., Маркель А. Л. МЕТАБОЛОМНЫЙ ЯМР-АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС НИСАГ (ISIAH) 335
Сидорова А. Ю., Азарнова Т. О., Луговая И. С. РЕГРЕССИЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В ОРГАНИЗМЕ ЭМБРИОНОВ КУР РАЗЛИЧНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ПРОДУКТИВНОСТИ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОЭНЗИМА Q10 336
Синицкий М. Ю., Цепокина А. В., Шишкова Д. К., Кутихин А. Г., Понасенко А. В. ЭКСПРЕССИЯ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ МИТОМИЦИНОМ С 337
Смирнов А. С., Супонин Д. А., Шилов Б. В., Федотчева Т. А. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЯДА ВЕЩЕСТВ ИЗ КЛАССА ПРЕГНАНОВЫХ СТЕРОИДОВ С ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДФ/АТФ-ТРАНСЛОКАЗОЙ 338
Smirnov V. V., Nedorezova D. D., Drozd V. S., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. DEVELOPMENT OF PROTECTIONS FOR ANTISENSE AND BINARY ANTISENSE AGENTS 340

Соболевская Э. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ SARS-COV-2
В ОРГАНАХ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *ACE2* ЧЕЛОВЕКА 342
Субботина К. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА НА ОСНОВЕ REAL-TIME PCR
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САРКОМЫ ЮИНГА 343
Сухинина Е. В., Першина А. Г. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ
РЕЦЕПТОРА ИНТЕГРИНА αVβ3 МЕТОДОМ CRISPR/CAS9 SAM-АКТИВАЦИИ 344
Сухомлинов Д. И., Переверзев И. М. GENECUT — ПРОГРАММНЫЙ ИНСТРУМЕНТ
ДЛЯ ДИЗАЙНА ОЛИГОНУЛЕОТИДОВ, СБОРКИ
И КЛОНИРОВАНИЯ ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ 345
Тарасенко А. А., Запарина О. Г., Ковнер А. В., Пахарукова М. Ю., Мордвинов В. А.
ИЗУЧЕНИЕ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РАН
МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОБРАБОТКОЙ ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНЫМ ПРОДУКТОМ
И ЛИЗАТОМ ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS* 347
Толстова П. О., Прохорова Д. В. Степанов Г. А. ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ МОНОМЕРОВ В СТРУКТУРЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 *IN VITRO* 348
Фандо А. А., Рудометова Н. Б., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н., Соколова А. С., Яровая О. И., Салахутдинов Н. Ф., Карпенко Л. И. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ
ПРОИЗВОДНЫХ КАМФОРЫ И ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОТНОШЕНИИ
ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1 349
Фёдорова Я. В., Кошкин А. О. РОЛЬ IS-ТРАНСПОЗОНОВ В ЭВОЛЮЦИИ CRISPR-CAS-СИСТЕМ 350
Фёдорова Ю. А. ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ ПРОМОТОРА ГЕНА *PCNA*
DROSOPHILA MELANOGASTER МЕТОДОМ TRIP 351
Царева Н. В. АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ
ПРИ ЕГО ГИПОПЛАЗИИ 352
Чумачева Ю. В., Сташкевич Д. С. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ
ГЕНА РЕЦЕПТОРА TNFRSF11B У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ 353
Шабурова Е. В., Антонец Д. В. СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ПАРАМЕТРИЗАЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В МОДЕЛЯХ ГЛУБОКОГО ОБУЧЕНИЯ 354
Шамраева М. А., Силкин С. В., Елиферов В. А., Бочаров К. В., Пеков С. И., Попов И. А.
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕКОНВОЛЮЦИЯ *IN SITU* ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИПИДОВ
В ПРОЦЕССЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТКАНЕЙ
ГОЛОВНОГО МОЗГА 355
Шарабрин С. В., Рудомётов А. П., Боргоякова М. Б., Волосникова Е. А., Зайковская А. В., Пьянков О. В., Карпенко Л. И., Ильичев А. А. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МРНК-ВАКЦИНА
ПРОТИВ SARS-COV-2 И ЕЕ ДОСТАВКА С ПОМОЩЬЮ КАТИОННОГО КОНЪЮГАТА
ПОЛИГЛЮКИН: СПЕРМИДИН 357
Шитик Е. М. ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ВЕКТОРОВ
НА ОСНОВЕ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ 1-ГО И 2-ГО СЕРОТИПОВ 358
Щепеникова П. В., Захарова К. С., Суворова А. О. РАЗРАБОТКА МИКРОЧИПА
С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ РЕАГЕНТАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
AEROMONAS HYDROPHILA, *AEROMONAS SALMONICIDA* И *YERSINIA RUKERI*
В РЫБЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ 359
Щаюк А. Н., Михаленко Е. П., Ефремов Н. А., Шепетько М. Н., Кильчевский А. В.
СПЕКТР МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С I И II СТАДИЯМИ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО 361
Eldeeb A. A., Zablotskaya S., Rubel M., Nour M. A. Y., Kolpashchikov D. M. ADVANCED DNA MACHINE
FOR THE AMPLIFICATION FREE DETECTION OF SARS-HCOV-2
IN THE CLINICAL SAMPLES 363
Eldeeb A. *A.,* **Patra C., Nedorezova D. D., Kolpashchikov D. 3M.** COOPERATIVITY FOR CANCER TREATMENT:
A THRESHOLDING DNA LOGIC GATE THAT IS ACTIVE AT HIGH CONCENTRATIONS
OF CANCER MARKER RNA 365
Ямщиков П. С., Патышева М. Р., Казакова Е. О., Ларионова И. В., Кжышковска Ю. Г.
ПОИСК РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ПРОФИЛЕМ МОНОЦИТОВ
БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 367

II

Ахметова Е. А., Логвина Н. А., Сергеева О. В., Зацепин Т. С. КОМБИНАЦИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕЛКА CAS9 И МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9 369
Гавриленкова А. А., Серова О. В., Ганцова Е. А., Горященко А. С., Петренко А. Г., Бочаров Э. В., Деев И. Е. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА (IR) 370
Данилин Н. А., Семиколенова О. А., Ким Д. В., Голышев В. М., Мещанинова М. И., Новопашина Д. С. ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ КАК ДОСТАВЛЯЮЩИЕ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 371
Дятлова А. С., Нестерко Е. Э. РЕАКЦИЯ ЯДЕР БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА ВВЕДЕНИЕ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ: ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА В 373
Ермаков Е. А., Невинский Г. А., Бунева В. Н. АНТИТЕЛА С ГИДРОЛИТИЧЕСКИМИ АКТИВНОСТЯМИ КАК МАРКЕРКЕРЫ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ 375
Казимиров П. В. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИЧ-1 НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН ЗА 2019–2020 ГОДЫ 376
Кобякова М. И., Штатнова Д. Ю., Ломовская Я. В., Ломовский А. И., Фадеев Р. С. МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ 378
Кучур О. А., Штиль А. А. ИНГИБИРОВАНИЕ p53 ЧЕРЕЗ CDK8/19 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ИОНИЗИРУЮЩЕМУ ИЗЛУЧЕНИЮ 379
Левданский О. Д., Шулинский Р. С., Мишук Е. А., Сивицкая Л. Н. CNV АНАЛИЗ ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КЛИНИЧЕСКИХ ЭКЗОМОВ ПАЦИЕНТОВ С НЕКОРОНАРОГЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СЕРДЦА 380
Ломовская Я. В., Дергилева А. Д., Кобякова М. И., Ломовский А. И., Фадеев Р. С. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК K562 В МИЕЛОИДНОМ НАПРАВЛЕНИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ФОРМИРОВАНИЕМ УСТОЙЧИВОСТИ К TRAIL-ИНДУЦИРОВАННОМУ АПОПТОЗУ 381
Ломовский А. И., Бабурина Ю. Л., Ломовская Я. В., Кобякова М. И., Фадеев Р. С., Крестинина О. В. МЕЛАТОНИН УСИЛИВАЕТ ДЕЙСТВИЕ ABT-737 НА КЛЕТКИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА MV4-11 382
Майкова А. С., Березенкова Н. В. РЕГУЛЯЦИЯ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS ПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* В УСЛОВИЯХ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК 383
Мальцева Ю. И., Горбенко Д. А., Рубель М. С., Шкоденко Л. А., Колпащиков Д. М. БЫСТРОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ МЕТОДОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ И ДНК-НАНОМАШИН 384
Меркульева Ю. А., Бондарь А. А., Андреева И. С., Щербаков Д. Н. АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЫ *B. THURINGIENSIS* ИЗ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА 386
Mungalov R. V., Turchaninova M. A., Chudakov D. M. STUDY OF T-CELL RECEPTORS ANTIGEN SPECIFICITY LANDSCAPE 388
Новикова Д. С., Пожарский А. А. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ АМФК НА ОСНОВЕ FRET-БИОСЕНСОРА 390
Пожарский А. А., Сагайдак А. В. СОЗДАНИЕ ТРАНСФЕЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С PGP-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ 391
Савинова Е. А., Ершова Е. С., Проскурнина Е. В., Костюк С. В. ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ [C60] И [C70] НА СИНТЕЗ АФК В ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА 392
Саламайкина С. А., Дрибноходова О. П., Дунаева Е. А., Есьман А. С., Бухарина А. Ю., Лешкина Г. В., Миронов К. О. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 393

Фабушева К. М., Дворник Ю. В. ВЛИЯНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА УРОВЕНЬ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ 394
Цымбал С. А., Агаджанян Н. А., Штиль А. А. ПРЕОДОЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЗА СЧЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕДИ АНТИОКСИДАНТАМИ 396
Шайдуллина Э. Р., **Эйдельштейн М. В., Марданова А. М.** МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГИПЕРВИРУЛЕНТНОЙ *K. PNEUMONIAE* В РОССИИ 398
Шкоденко Л. А., Рубель М. С., Мальцева Ю. И. ОПТИМИЗАЦИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕНОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ДЕЗОКСИРИБОЗИМНЫМИ БИНАРНЫМИ СЕНСОРАМИ 399
Щеглов Б. О. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА TGFB2 НА РАЗВИТИЕ ИСТОНЧЕНИЯ РОГОВИЦЫ ПРИ СИНДРОМЕ ЛОЙСА — ДИТЦА 400
Юдкина А. В., Жарков Д. О. КОДИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МЕТОКСИАМИНА — ИНГИБИТОРА РЕПАРАЦИИ ДНК С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ 401

Алфавитный указатель 402

Научное издание

VIII МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ: БИОФИЗИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

Сборник тезисов

Корректоры
Д. М. Валова, Т. В. Иванова, Т. А. Маркова
Верстка *А. С. Терешкиной*
Обложка *Е. В. Неклюдовой*

Подписано в печать 5.10.2021 г.
Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 53. Усл. печ. л. 49,2.
Тираж 120 экз. Заказ № 184.
Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

OPENBIO — ОТРАСЛЕВОЙ КОМПЛЕКС МЕРОПРИЯТИЙ

исследования | инновации | развитие бизнеса в сфере lifescience

Площадка открытых коммуникаций OpenBio – комплекс мероприятий, посвященных коммерциализации идей и развитию бизнеса в сфере наук о жизни.

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ БИОФИЗИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ

ВЫСТАВКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ

НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ: ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА МИКРОМИРА

ISBN 978-5-4437-1237-6

OPENBIO.RU

OPENBIO.RU OPENBIO