OPEN BIO

LIFESCIENCE EVENT

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

XII МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ БИОИНФОРМАТИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ, ВИРУСОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И СПЕЦИАЛИСТОВ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

В РАМКАХ ПЛОЩАДКИ ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО, 2025

Вектор

ИЦК ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР КОЛЬЦОВО

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО

БИОТЕХНОПАРК КОЛЬЦОВО

БИОФАРМ

Новосибирский областной инновационный фонд

XII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ: БИОИНФОРМАТИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ, ВИРУСОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И СПЕЦИАЛИСТОВ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2025

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

М431 XII Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины — 2025 : сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2025. — 776 с.

ISBN 978-5-4437-1843-9

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной научно-практической конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2025.

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

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

ISBN 978-5-4437-1843-9
DOI 10.25205/978-5-4437-1843-9

© АНО «Инновационный центр Кольцово», 2025

РАЗДЕЛ I

БИОИНФОРМАТИКА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-1

ASSEMBLY OF COMPLETE SEA BUCKTHORN GENOME USING NANOPORE SEQUENCING AND THE HIFIASM ONT ALGORITHM *

A. A. Arkhipov[1], E. N. Pushkova[1], N. L. Bolsheva[1], V. V. Babenko[2], K. M. Klimina[2], Yu. A. Zubarev[3], N. V. Melnikova[1], A. A. Dmitriev[1]

[1] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*
[2] *Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow*
[3] *Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies, Barnaul*

✉ arkhipov.aleksandr2.0@gmail.com

Abstract

Sea buckthorn is used in food and pharmaceuticals. We sequenced the DNA of sea buckthorn on the Oxford Nanopore Technologies platform and assembled the genome using the Hifiasm ONT algorithm. The assembly was 1.17 Gb long, and 11 of 12 chromosomes were complete. The BUSCO completeness was 96.8 %. Telomeric repeats were found at both ends of 11 of 12 chromosomes. Thus, a near-telomere-to-telomere (T2T) assembly of the sea buckthorn genome was obtained.

Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) is a valuable woody oil plant, which is used in food and pharmaceuticals. However, from a genetic point of view, sea buckthorn is an understudied species. In recent years, several genomes of *H. rhamnoides* were assembled using third-generation sequencing and the Hi-C approach, but they are still far enough from the telomere-to-telomere (T2T) level. Meanwhile, T2T genome assemblies are becoming the new standard in plant genomics. We aimed to obtain a T2T assembly of the *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* genome, which is cultivated in Russia.

We obtained pure high-molecular-weight DNA of the variety Triumf of *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* using the nuclei isolation with subsequent CTAB extraction and column purification. Then DNA was prepared using the SQK-LSK114 kit and sequenced on PromethION (Oxford Nanopore Technologies (ONT)) with R10.4.1 flow cells.

About 155 Gb of raw ONT reads with an N50 of 31.4 kb were obtained. Basecalling was performed using the Dorado tool (v.1.0.2, dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup@v5.2.0). Reads with a length less than 10 kb and an average quality less than Q10 were filtered out. Genome assembly was performed using the Hifiasm ONT algorithm (v.0.25.0) with parameters optimized for ONT data. Assembly parameters, such as length, number of contigs, and others were evaluated using QUAST (v.5.3.0) and BUSCO (v.5.8.3). The TIDK software package (v.0.2.64) was used to detect telomeric sequences in the assembly.

The obtained genome assembly of the variety Triumf was presented by 13 contigs: 11 complete chromosomes and one chromosome consisting of two contigs. The assembly had a high BUSCO completeness of 96.8%. We compared the Triumf genome assembly with the previously obtained assemblies of *H. rhamnoides*: NCBI, GCA_033030585.1 and CNGB, CNP0001846. The Triumf genome assembly was longer than the other genome assemblies (1.17 vs 0.92 and 0.73 Gb) and had a higher contig N50 value (83.7 vs 14.8 and 3.5 Mb).

Eleven of twelve chromosomes of the Triumf genome assembly had telomeric repeats at both ends and one chromosome (Chr 3) had telomeric repeats at one end. We also searched for telomeric repeats in other available sea buckthorn genome assemblies: NCBI, GCA_033030585.1 and CNGB, CNP0001846. Absence of telomeric repeats at chromosome ends or their incorrect location were frequent, indicating incomplete or erroneous assemblies.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #23-46-00026).

© A. A. Arkhipov, E. N. Pushkova, N. L. Bolsheva, V. V. Babenko, K. M. Klimina, Yu. A. Zubarev, N. V. Melnikova, A. A. Dmitriev, 2025

Thus, the near-T2T genome of the variety Triumf was assembled. The assembly surpassed the previously obtained genomes of *H. rhamnoides* in terms of length, contiguity, and presence of telomeric repeats at chromosome ends. The genome assembly of the variety Triumf is an essential tool for a range of basic and applied studies on sea buckthorn, including genome editing.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-2

IN SILICO ANALYSIS OF THE MESOCARB-TYPE MOLECULES INTERACTION WITH THE DOPAMINE TRANSPORTER AS POTENTIAL ANTI-AUTOIMMUNE AGENTS *

D. S. Bug[1], I. M. Sukhanov[1], I. A. Cherepanov[2], S. K. Moiseev[2], N. V. Petukhova[1]

[1] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*
[2] *A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS, Moscow*

✉ petuhovanv@1spbgmu.ru

Abstract

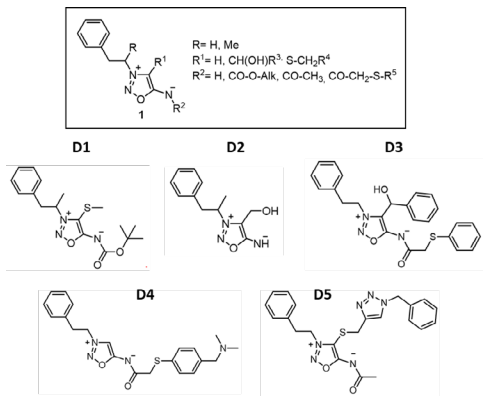
We have designed new mesocarb derivatives with the aim of investigating their binding affinity towards the dopamine transporter (DAT). Induced-fit docking studies into two protein conformational states and corresponding binding affinities revealed substantial binding interactions with DAT surpassing the controls. This finding suggests the efficacy of selected scaffold for further DAT-targeted therapeutics development.

Dopamine Transporter (DAT) inhibitors have emerged as highly promising therapeutic agents in the management of diverse neuro-psychiatric disorders [1]. It is well-established that DAT inhibition plays a crucial role in addressing Parkinson's disease [2] and has been thoroughly investigated for clinical applications in treating several mental health conditions [3–6]. The varied pharmacological effects observed with DAT ligands can be explained by the distinct ways in which different compounds interact with the transporter protein.

Two primary categories of DAT inhibitors have been identified: atypical inhibitors that bind mostly to the inward-facing (*IF*state) conformation of the transporter or induce a conformational change from the metastable state to the occluded state; and cocaine-like compounds that preferentially target the outward-facing (*OF*state) conformation of DAT [7]. The orthosteric site S1/S2 serves as the primary binding region for both natural substrates and various medications [8–10].

Recent studies demonstrated that the dopaminergic system is involved in the regulation of immune responses in various homeostatic and disease conditions inhibiting neuroinflammation [11]. This connection between dopamine and immune regulation opens new avenues for therapeutic development by modulating dopamine levels. Several similar to mesocarb structures were patented for using dopamine reuptake inhibitors and their analogs for treating autommune conditions or preventing autoimmune related pathologic progressions [12]. Taking everything into account, we have designed the set of novel mesocarb-derivatives in order to investigate their ability to bind to DAT, under the premise that structural similarities would result in similar pharmacological activity.

To validate this hypothesis, a series of structurally analogous compounds was synthesized. Compound 1 (the scaffold) exhibits structural homology to mesocarb, with key variations centered around the presence or absence of a methyl group at the α-position of the substituent attached to nitrogen atom N3 within the oxadiazole ring system. The molecular architecture displays the following characteristics: oxadiazole core with defined substituent patterns; position 4 modifications consist of incorporation of proton, thioalkyl, and hydroxymethyl groups; N6 position contains of sydnonymine base salts, acyl groups, and alkoxycarbonyl substituents (see figure). The synthetic approach for generating these derivatives adhered to previously established protocols for sydnone imine modification. These methodologies were specifically tailored to introduce targeted structural variations while preserving the essential framework required for biological activity [13–17].



Initial scaffold (*1*) and designed derivatives (*D1–D5*)

All modeling, protein and ligands preparation, induced-fit docking and MM-GBSA affinity calculation were performed in Schrödinger molecular modeling suite (version 2022-4, version 2024-1) as described previously [18]. *OF*state and *IF*state of DAT were obtained by homology modeling on the templates of PDB 4M48 and PDB 6DZZ, respectively. Induced-fit docking protocol was used with defaults parameters with receptor grid centered at the co-crystalized ligands of both DAT protein states within the S1/S2 binding site.

* The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement #58.3).
© D. S. Bug, I. M. Sukhanov, I. A. Cherepanov, S. K. Moiseev, N. V. Petukhova, 2025

The docking results, combined with MM-GBSA ΔG_{bind} calculations for the top-poses (see table), revealed significant insights into the binding behavior of the scaffold derivatives indicating the optimal conformations of ligands within the S1/S2 sites. All compounds D1–D5 demonstrated nearly identical binding affinity to both DAT states, comparable to mesocarb. Notably, compound D3 exhibited significantly enhanced binding to the *OF*state of DAT. The calculated binding affinities of the designed ligands surpassed those of both cocaine and dopamine. These results collectively support the potential of the designed compounds as promising candidates for dopamine transporter-targeted drug development, highlighting the suitability of the chosen scaffold for future therapeutic applications.

Results of induced-fit docking and corresponding MM-GBSA binding affinities of top-poses within both DAT states

Ligand	DAT *OF*state		DAT *IF*state	
	XPscore (kkal/mol)	ΔG_{bind} (kkal/mol)	XPscore (kkal/mol)	ΔG_{bind} (kkal/mol)
Dopamine	−7,3	−43,55	−7,86	−36,97
Cocaine	−9,1	−58,27	−12,1	−67,35
Mesocarb	−12,36	−76,54	−11,83	−71,83
D1	−9,53	−62,85	−9,32	−64,95
D2	−10,65	−55,22	−9,19	−51,6
D3	−13,84	−104,41	−11,11	−79,66
D4	−10,31	−86,28	−12,84	−84,65
D5	−12,09	−75,25	−10,28	−67,81

References

1. Mavel S., Mincheva Z., Méheux N. et al. QSAR study and synthesis of new phenyltropanes as ligands of the dopamine transporter (DAT) // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2012. Vol. 20, No. 4. P. 1388–1395.

2. Huot P., Fox S. H., Brotchie J. M. Dopamine reuptake inhibitors in Parkinson's disease: A review of nonhuman primate studies and clinical trials // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2016. Vol. 357, No. 3. P. 562–569.

3. Zou M.-F., Cao J., Abramyan A. M. et al. Structure–activity relationship studies on a series of 3α-bis(4-fluorophenyl)methoxytropanes and 3α-bis(4-fluorophenyl)methylaminotropanes as novel atypical dopamine transporter (DAT) inhibitors for the treatment of cocaine use disorders // Journal of Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 60, No. 24. P. 10172–10187.

4. Fava M., Rush A. J., Thase M. E. et al. 15 years of clinical experience with bupropion HCl: From bupropion to bupropion SR to bupropion XL // The Primary Care Companion for CNS Disorders. 2005. Vol. 7, No. 3. P. 106–113.

5. Solis E., Suyama J. A., Lazenka M. F. et al. Dissociable effects of the prodrug phendimetrazine and its metabolite phenmetrazine at dopamine transporters // Scientific Reports. 2016. Vol. 6, No. 1. P. 31385.

6. Murillo-Rodríguez E., Barciela Veras A., Barbosa Rocha N. et al. An overview of the clinical uses, pharmacology, and safety of modafinil // ACS Chemical Neuroscience. 2018. Vol. 9, No. 2. P. 151–158.

7. Schmitt K. C., Reith M. E. A. The atypical stimulant and nootropic modafinil interacts with the dopamine transporter in a different manner than classical cocaine-like inhibitors // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, No. 10. P. e25790.

8. Aggarwal S., Mortensen O. V. Overview of monoamine transporters // Current Protocols in Pharmacology. 2017. Vol. 79, No. 1. P. 12.16.1–12.16.17.

9. Quick M., Abramyan A. M., Wiriyasermkul P. et al. The LeuT-fold neurotransmitter:sodium symporter MhsT has two substrate sites // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. Vol. 115, No. 34.

10. Shi L., Quick M., Zhao Y. et al. The mechanism of a neurotransmitter:sodium symporter—Inward release of Na+ and substrate is triggered by substrate in a second binding site // Molecular Cell. 2008. Vol. 30, No. 6. P. 667–677.

11. Ashraf-Uz-Zaman M., Ji G., Tidwell D. et al. Evaluation of urea-based inhibitors of the dopamine transporter using the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis // ACS Chemical Neuroscience. 2022. Vol. 13, No. 2. P. 217–228.

12. Chen H., Miagkov A., Leary L. et al. Method of using dopamine reuptake inhibitors and their analogs for treating autommune conditions and delaying or preventing autoimmune related pathologic progressions // United States Patent Application Publication. 2012. US 2012/0264698 A1.

13. Cherepanov I. A., Lebedev S. N., Samarskaya A. S. et al. 4-Thio derivatives of sydnone imines // Mendeleev Communications.

14. Cherepanov I. A., Kalinin V. N. Synthesis and reactivity of 4-lithium and 4-copper derivatives of sydnone imines // Mendeleev Communications. 2000. Vol. 10, No. 5. P. 181–182.

15. Cherepanov I. A., Kusaeva L. H., Godovikov I. A., Kalinin V. N. 4-Formylsydnonimine derivatives // Russian Chemical Bulletin. 2009. Vol. 58, No. 12. P. 2474–2477.

16. Samarskaya A. S., Cherepanov I. A., Godovikov I. A., Kalinin V. N. N6-α-haloacyl sydnone imine derivatives // Doklady Chemistry. 2015. Vol. 463, No. 2. P. 199–203.

17. Cherepanov I. A., Samarskaya A. S., Godovikov I. A. et al. N6-tert-Butoxycarbonyl derivatives of sydnone imines: Preparation and synthetic use // Tetrahedron Letters. 2018. Vol. 59, No. 8. P. 727–729.

18. Semenov K. N., Prokopiev I. A., Petukhova N. V. et al. Atranorin is a novel potential candidate drug for treating myelodysplastic syndrome // Journal of Molecular Liquids. 2024. Vol. 413. P. 125743.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-3

IDENTIFICATION OF EVOLUTIONARILY TOLERATED GENETIC VARIANTS USING PSEUDOREADS OF ORTHOLOGOUS SEQUENCES

D. S. Bug, A. V. Tishkov, N. V. Petukhova

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

✉ bug.dmitrii@yandex.ru

Abstract

We present GAPO, a novel method for detecting evolutionarily tolerated genetic variants by analyzing orthologous sequences. Applied to 272 cancer genes, GAPO identified 9,054 rare variants (98 % absent in gnomAD), revealing changes preserved across species but infrequent in humans. Unlike population variation databases, GAPO pinpoints variants permitted by long-term evolution, offering insights into benign genomic variation.

Introduction

The rapid advancement of molecular diagnostics has created a growing demand for improved variant interpretation methods. Current tools primarily focus on predicting the pathogenicity of coding and splicing variants, with limited attention given to non-coding regions—until recently, with the introduction of AlphaGenome. It is important to note that AlphaGenome does not incorporate evolutionary conservation into its pathogenicity predictions. Furthermore, existing variant effect predictors do not take into account specific sequence changes observed throughout evolution.

Previously, we developed the Genetic Alignment of Pseudoreads for Homologs (GAPH) method, which identifies specific sequence changes between human genes and homologous genomic sequences across species. However, the homology search was insufficiently selective, which may lead to capturing paralogs—evolutionarily related but functionally distinct genes—alongside orthologs, resulting in noisy datasets.

Materials and methods

For this study, we analyzed 272 classic cancer genes from the COSMIC database [1]. Ortholog identification was performed using "Pavlov's COGs", our Linux-based tool for evolutionary reconstruction based on clusters of orthologous groups (COGs). This tool leverages a local BLAST database of high-quality genomes pre-selected using BUSCO completeness scores. Orthologs were defined as genes belonging to the largest maximal clique in the orthology graph.

Orthologous gene sequences were retrieved using the NCBI Datasets utility [2] and fragmented into 70-nucleotide pseudoreads with a 35-nucleotide overlap. Each base was assigned a Phred quality score of 30. Pseudoreads were aligned to the corresponding human reference gene sequences using BWA-MEM (default parameters) [3]. Variant calling was performed with VarScan v2 [4], applying a minimum threshold of two supporting reads and 8x read-depth coverage. Finally, variants were annotated using the Franklin VCF-annotation tool.

Results and discussion

We present GAPO (Genetic Alignment of Pseudoreads for Orthologs), an advanced method for identifying evolutionarily conserved variants in cancer-related genes. Applying GAPO to 272 COSMIC classic cancer genes, we detected 9,054 genetic variants, most of which were classified as likely benign or variants of unknown significance (VUS). Only five variants were predicted as likely pathogenic, and no pathogenic mutations were identified (see table).

Notably, only 2 % (178/9,054) of the discovered variants were previously documented in population allele frequency databases (gnomAD, 1000 Genomes, ExAC). This stark discrepancy underscores GAPO's unique capacity to identify rare variants that have been evolutionarily permitted across species—a critical distinction from population databases, which primarily reflect variants that have survived recent human selection pressures. While population databases capture variants that are tolerated in modern human populations, GAPO reveals a deeper evolutionary perspective by detecting variants that have persisted across long-term species divergence, despite their rarity in human populations.

Our prior approach, GAPH, identified over 5 million variants across homologous sequences [5]. In contrast, GAPO reduces this to a highly refined set of 9,054 variants by enforcing strict orthology criteria and high-quality sequence inclusion. While this conservative approach enhances precision, adjusting GAPO's parameters (e. g., relaxing orthology thresholds) could expand variant detection for specific applications.

In conclusion, GAPO represents a significant methodological advancement for identifying potentially benign variants in orthologous sequences, offering a robust framework for evolutionary and clinical genomics.

© D. S. Bug, A. V. Tishkov, N. V. Petukhova, 2025

Distribution of variants by their clinical relevance

Clinical relevance category	Number of variants
Benign	13
Likely benign	6
Possibly benign variants of unknown significance	8581
Uncertain significance	413
Possibly pathogenic variants of unknown significance	36
Likely pathogenic	5
Pathogenic	0

References

1. Tate J. G., Bamford S., Jubb H. C. et al. COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer // Nucleic Acids Research. 2019. Vol. 47. P. D941–D947.

2. O'Leary N. A., Cox E., Holmes J. B. et al. Exploring and retrieving sequence and metadata for species across the tree of life with NCBI Datasets // Scientific Data. 2024. Vol. 11. P. 732.

3. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1754–1760.

4. Koboldt D. C., Zhang Q., Larson D. E. et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing // Genome Research. 2012. Vol. 22. P. 568–576.

5. Bug D., Narkevich A., Petukhova N. Alignment of pseudoreads obtained from homologous sequences in identifying potentially tolerated genomic variants // Journal of Bioinformatics and Genomics. 2023. Vol. 21. P. 7.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-4

GENOTYPIC DIFFERENTIATION AND EVOLUTIONARY DYNAMICS OF *PUUMALA ORTHOHANTAVIRUS* (PUUV)

M.A. Dashian[1], I.A. Volkhin[2], A.A. Deviatkin[3]

[1] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*
[3] *Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow*

✉ ria.dashyan@gmail.com

Abstract

PUUV is a causative agent of haemorrhagic fever with renal syndrome [1]. Its current classification is not standardized and relies on geographic lineages, but inconsistencies arise between the names of the lineages and their actual distribution, and in some cases, intralineage genetic diversity is higher than interlineage diversity. In this study, we propose a standardized classification based on genetic distances to resolve taxonomic ambiguities.

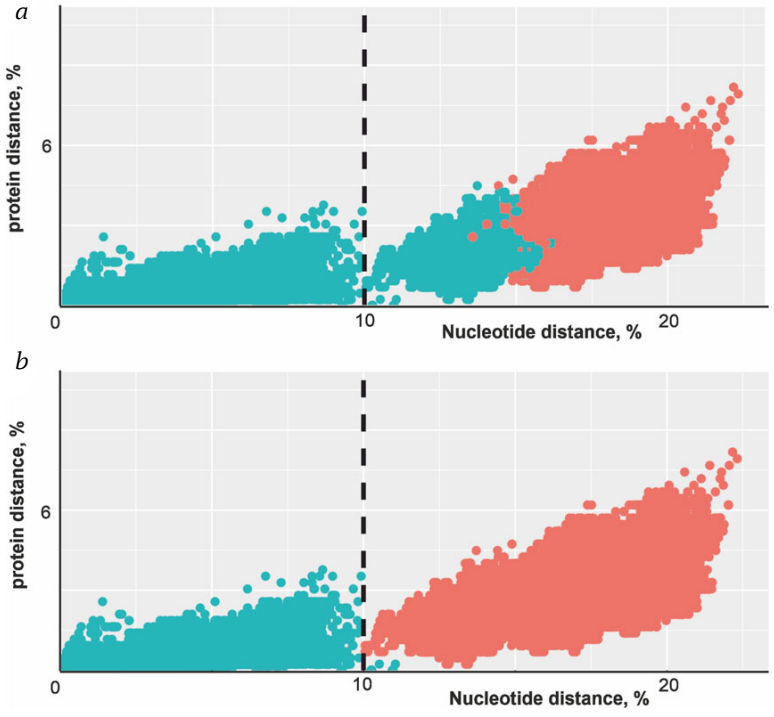
Materials and methods

We analyzed 505 complete S segment sequences from GenBank, focusing on the gene encoding nucleocapsid protein. Recombination and reassortment events were assessed using RDP4 [2], GIRaF [3], and phylogenetic incongruence analysis. Pairwise nucleotide and amino acid sequences were calculated for all possible pairs of sequences. Each pair of sequences in the dataset was represented by a dot on the plot with coordinates reflecting the nucleotide and amino acid sequence distance between them. Each dot was coloured according to whether the virus pair consisted of inter- or intragroup viruses (see figure).

Results

A “10 % nucleotide difference” threshold was applied to delineate genotypes.

PUUV was subdivided into 21 distinct genotypes, with lineages like CE, RUS, FIN, and N-SCA further divided into geographically coherent subgroups. Reassortment events were rare but detected, confirming segment exchange in PUUV evolution. The S segment, due to its stability and low recombination frequency, proved optimal for phylogenetic analysis.



Scatter plot of amino acid and nucleotide distances for pairs of PUUVs S segments: *a* — intralineage virus pairs were indicated by cyan dots, interlineage virus pairs by red dots. Lineage assignments were made according to [4, 5]. The threshold of 10 % nucleotide difference is shown as a vertical dashed line; *b* — implementation of tentative quantitative criteria for the PUUV taxonomic assignment at the subspecies level. Intracluster virus pairs (difference less than 10 % nucleotide distance) are indicated by cyan dots, intercluster (difference more than 10 % nucleotide distance) virus pairs by red dots. The threshold of 10 % nucleotide difference is indicated as a vertical dashed line

© M.A. Dashian, I.A. Volkhin, A.A. Deviatkin, 2025

Conclusion

The proposed 10 % nucleotide difference criterion provides a robust, quantitative framework for PUUV genotyping, enhancing taxonomic clarity and reflecting evolutionary relationships. This study highlights limitations of geographic-based classification.

Significance

This work suggests a more transparent hantavirus taxonomy, offering a reproducible method for genotype classification that can be extended to other segmented RNA viruses. It underlines the applicability of genetic distance metrics to viral phylogeny.

References

1. Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J. et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections // Nature reviews. Microbiology. 2013. Vol. 11 (8). P. 539–550.

2. Martin D. P., Murrell B., Golden M. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // Virus Evolution. 2015. Vol. 1 (1). P. vev003.

3. Nagarajan N., Kingsford C. GiRaF: robust, computational identification of influenza reassortments via graph mining // Nucleic Acids Research. 2011. Vol. 39 (6). P. e34.

4. Castel G., Chevenet F., Razzauti M. et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe // Viruses. 2019. Vol. 11 (8).

5. Blinova E., Deviatkin A., Makenov M. et al. Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia // Emerging Infectious Diseases. 2023. Vol. 29 (7). P. 1420–1424.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-5

COMPARATIVE ANALYSIS OF CHROMOSOME-LEVEL FLAX GENOME ASSEMBLIES FROM R9 NANOPORE DATA

E. M. Dvorianinova[1], A. A. Arkhipov[1], N. L. Bolsheva[1], E. N. Pushkova[1], T. A. Rozhmina[2], E. V. Borkhert[1], E. A. Sigova[1], D. A. Zhernova[1], N. V. Melnikova[1], A. A. Dmitriev[1]

[1] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*
[2] *Federal Research Center for Bast Fiber Crops, Torzhok*

✉ dvorianinova.em@phystech.edu

Abstract

Flax is a perspective agriculture of a vast application. In this work, we assembled the genomes of six genetically distinct flax varieties valuable for breeding from R9 Nanopore reads. The constructed assemblies had a chromosome level and possessed a quite similar structure. However, a range of chromosomal rearrangements were observed, including long inversions and deletions.

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is a multipurpose crop cultivated to obtain oil and fiber. This produce is demanded by numerous industries, e.g., manufacturing functional nutrition, bioactive supplements, paints, medical products, fibers, and composite materials. Therefore, each industry requires growing flax varieties with a target complex of characteristics tailored for their main use. Modern breeding methods can effectively solve this task. The techniques employed are based on the knowledge of the key plant characteristics organization at the genome level. Meanwhile, interspecific genetic heterogeneity is common for plants. To receive complete information on genetic determinants of the valuable plant traits, the power of a comparative genomic analysis can be harnessed. This study aimed to obtain and compare chromosome-level genome assemblies of genetically diverse flax varieties of high breeding value.

The genomes of six varieties (Alizee, K-470, K-1570, K-1230, K-432, and K-5543) were sequenced on the Oxford Nanopore Technologies (ONT) platform on the PromethION instrument (R9.4.1 flow-cells). The received genomic data was basecalled with Dorado 0.9.6 and filtered by the quality threshold of 15 or 16 and the length of 10-15 kb. The assembly was performed using Hifiasm 0.25.0. The resulting genome sequences were analyzed with QUAST 5.0.2, BUSCO 5.8.3, and tidk 0.2.65. The final assemblies were aligned to the genome of the K-470 variety using LAST 2.39.3.

The updates in sequencing technologies and data processing instruments allowed us to assemble flax genomes of high contiguity and completeness even from R9 Nanopore data. For the six sequenced varieties, we received an average volume of raw reads of 131 Gb with an average N50 of 25 kb. The obtained genome assemblies had a BUSCO completeness of 95.4 % and a size of 477.8–492.9 Mb. The L50 parameters of these assemblies were close to half of a haploid set of flax chromosomes (2n = 30) with the median of 8. These assemblies had an L90 of 17–26 and an N50 of 17.1–29.7 Mb. The obtained genomes were checked for the presence of a telomere repeat across the contigs. The majority of the analyzed contigs had telomeres at least at one end. The assemblies of Alizee, K-470, and K-432 possessed the highest number of contigs (9) ending and beginning with telomeres. The conducted analyses demonstrated that the constructed genomes had a near-chromosome level.

The alignment of the obtained genomes of different flax genotypes demonstrated high similarity between them. Nevertheless, a range of structural variations was present in flax chromosomes — mainly long deletions and inversions. For instance, the K-1230 genome had a 4-Mb deletion in chromosome 8, two deletions of 2- and 3-Mb lengths in chromosome 10, a 2-Mb deletion in chromosome 6, and a 3-Mb inversion in chromosome 8. In the assembly of the variety K-1570, we observed a 3.5-Mb deletion followed by a 4.5-Mb inversion in chromosome 10. The identified structural variations can have an impact on genome regulation of the studied varieties. For instance, the deleted sequences in the genome of K-1230 were similar to microsatellites, which can play an important role in gene expression.

The results of the study contribute to the understanding of the genomic diversity of flax. The obtained genomes are a multifunctional bioinformatics instrument, which can simplify the marker-assisted and genomic selection of flax varieties with a target complex of traits.

© E. M. Dvorianinova, A. A. Arkhipov, N. L. Bolsheva, E. N. Pushkova, T. A. Rozhmina, E. V. Borkhert, E. A. Sigova, D. A. Zhernova, N. V. Melnikova, A. A. Dmitriev, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-6

PREDICTION CYTOKINE-INDUCING EPITOPES USING PROTEIN LANGUAGE MODELS

A. D. Gavrilenko, M. A. Sindeeva, S. V. Shashkova

Autonomous Non-Profit Organization "Artificial Intelligence Research Institute", Moscow

✉ Gavrilenko@airi.net

Abstract

We present a machine learning approach for classifying epitopes by their ability to induce specific cytokines (IL-2, IL-4, IL 10), using contextual embeddings from protein language models and ensemble gradient boosting classifiers. Our method achieves high predictive performance, particularly for IL-10.

In this study, we propose a data-driven method for binary classification of T cell epitopes based on their ability to induce the secretion of specific cytokines: IL-2, IL-4, or IL-10. The central idea is to leverage contextual embeddings generated by state-of-the-art protein language models (ESM Cambrian (ESM C) [1] and Ankh [2]) as features for training gradient boosting ensembles (LightGBM, CatBoost) within the LightAutoML [3] framework.

Experimentally validated human epitopes were extracted from the Immune Epitope Database (IEDB, February 2025) [4]. For each cytokine, balanced datasets were constructed using SMOTE [5] or ADASYN [6] oversampling techniques, addressing class imbalance in positive vs. negative examples.

As baselines, we implemented classifiers using handcrafted sequence-based descriptors: Amino Acid Composition (AAC), Dipeptide Composition (DPC), and Amino Acid Pair (AAP) antigenicity scores. These served as a reference to quantify the added value of deep contextual representations.

Models were evaluated using standard metrics: precision, recall, AUC, and Matthews Correlation Coefficient (MCC). For IL-10 prediction, our best model based on ESM C embeddings achieved AUC = 0.918 and MCC = 0.641 (see table), outperforming previous methods such as IL10Pred [7]. Comparable or superior results were also obtained for IL-2, while IL-4 remained more challenging due to its higher sequence diversity.

To explore this variability, we calculated sequence-level statistics across cytokine classes, including Shannon entropy, dipeptide density, and average Levenshtein distance. IL-4-inducing epitopes displayed the highest variability, while IL-10 epitopes were more conserved—explaining the observed differences in classification accuracy.

In summary, protein language models enable efficient, generalizable, and scalable prediction of cytokine-inducing epitopes directly from amino acid sequences. This approach is especially useful for in silico immunogenicity discovery and prioritization of candidate peptides for experimental validation.

Performance of ESM C model for cytokine-inducing epitope classification

Cytokine	Precision	Recall	MCC	AUC
IL-2	0.776	0.819	0.564	0.855
IL-4	0.717	0.833	0.433	0.795
IL-10	0.727	0.796	0.641	0.918

References

1. ESM Team. ESM Cambrian: Revealing the mysteries of proteins with unsupervised learning. 2024.

2. Elnaggar A. et al. Ankh: Optimized Protein Language Model Unlocks General-Purpose Modelling. 2023.

3. Vakhrushev A. et al. LightAutoML: AutoML Solution for a Large Financial Services Ecosystem // arXiv:2109.01528. 2021. URL: https://doi.org/10.48550/arXiv.2109.01528.

4. Vita R. et al. The Immune Epitope Database (IEDB): 2024 update // Nucleic Acids Research. 2025. Vol. 53, No. D1. P. 436–443. URL: https://doi.org/10.1093/nar/gkae1092.

5. Chawla N. V. et al. SMOTE: Synthetic Minority Over-sampling Technique // J. Artif. Intell. Res. 2002. Vol. 16. P. 321–357. URL: https://doi.org/10.1613/jair.953.

6. He H., Garcia E. A. Learning from Imbalanced Data. IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering. 2009. Vol. 21, No. 9. P. 1263–1284.

7. Nagpal G. et al. Computer-aided designing of immunosuppressive peptides based on IL-10 inducing potential. Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 42851. URL: https://doi.org/10.1038/srep42851.

©A. D. Gavrilenko, M. A. Sindeeva, S. V. Shashkova, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-7

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR PREDICTING CHROMOTHRIPSIS IN THE HUMAN GENOME USING MACHINE LEARNING ALGORITHMS

P. E. Karitskaia, Y. V. Vyatkin

Novosibirsk State University

✉ p.karitskaya@g.nsu.ru

Abstract

A comparison was conducted between classical machine learning algorithms and a BiLSTM-based neural network for predicting chromothripsis events in the human genome using structural variation data. The BiLSTM model, which processes sequential input, demonstrated significantly higher classification performance (PR AUC 0.94 vs. 0.78 for the best classical model), highlighting its potential for clinical diagnostics.

Introduction

Chromothripsis is a phenomenon involving multiple chromosomal rearrangements that occur as a result of a single catastrophic event. It is associated with poor prognosis in cancer and has high diagnostic value. Current chromothripsis detection algorithms are often based on statistical approaches that require manual parameter tuning [1, 2], or they are highly specialized — for example, trained only on copy number variation (CNV) data or specific cancer types [3].

Aim — to develop a method for predicting chromothripsis events in the human genome based on structural variation (SV) data using machine learning and deep learning algorithms.

Materials and methods

The study was conducted using data from ChromothripsisDB, the largest annotated repository of chromothripsis cases [3]. After preprocessing and filtering, the final dataset included 19713 events.

For classical machine learning, aggregated features were used, such as the number and types of structural variations (SVs) within a genomic region. Logistic regression, support vector classifier (SVC), random forest, and XGBoost models were tested [4]. Class imbalance (11.4 % positive cases) was addressed using the SMOTE method and class weighting [5]. Ensemble methods such as Voting and Stacking were applied to improve performance.

For the deep learning approach, a custom architecture was developed to work directly with SV sequences. Each genomic region was represented as a sequence of 200 events, where each event was described by 10 features (coordinates, type, read support, etc.). A two-layer bidirectional LSTM network (BiLSTM) with an attention mechanism was implemented [6]. To handle class imbalance, a WeightedRandomSampler and a combined loss function (Focal Loss + F1 Loss) were used. The model was trained using 10-fold stratified cross-validation.

Results

Comparison of classical machine learning models on a hold-out test set showed that the XGBoost algorithm achieved the best performance, with ROC AUC = 0.93 and PR AUC = 0.78. Ensemble methods yielded similar results but did not provide a significant improvement (see table).

The developed BiLSTM-based neural network outperformed all classical models across key metrics. On validation folds, the model achieved average scores of ROC AUC = 0.95 and PR AUC = 0.94 (see figure). Training dynamics analysis indicated a stable decrease in loss without signs of overfitting, confirming the effectiveness of the applied regularization methods and the model's ability to generalize.

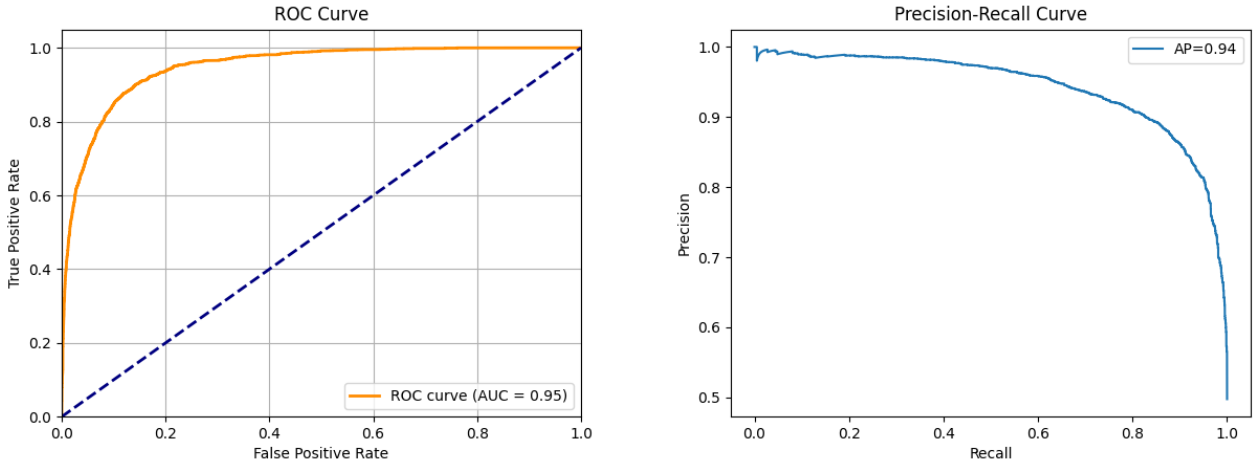
Conclusions

The proposed architecture based on a bidirectional LSTM network with an attention mechanism demonstrated superior predictive performance compared to classical machine learning algorithms. This is attributed to the model's ability to capture complex spatial and contextual dependencies in structural variation sequences, which are lost during feature aggregation. The results confirm the potential of deep learning for analyzing raw genomic data and lay the groundwork for developing more accurate and automated tools for clinical diagnostics.

© P. E. Karitskaia, Y. V. Vyatkin, 2025

Comparative metrics of models on the hold-out test set

Model	ROC AUC	PR AUC	F1-score
LogReg	0.92	0.74	0.62
SVM	0.91	0.74	0.67
Random Forest	0.93	0.74	0.58
XGBoost	0.93	0.78	0.73
Voting	0.93	0.77	0.69
Stacking	0.93	0.78	0.73
BiLSTM + Attention	0.95	0.94	0.70



ROC (*left*) and Precision-Recall (*right*) curves for the BiLSTM network in the chromothripsis event classification task

References

1. Govind S. K. et al. ShatterProof: operational detection and quantification of chromothripsis // BMC Bioinformatics. Springer Science and Business Media LLC. 2014. Vol. 15, No. 1.

2. Cortés-Ciriano I. et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing // Nat. Genet. Springer Science and Business Media LLC. 2020. Vol. 52, No. 3. P. 331–341.

3. Yu J. et al. Chromothripsis detection with multiple myeloma patients based on deep graph learning // Bioinformatics / ed. Lu Z. Oxford University Press (OUP). 2023. Vol. 39, No. 7.

4. James G. et al. An Introduction to Statistical Learning // Springer Texts in Statistics. Springer International Publishing, 2023.

5. Chawla N. V. et al. SMOTE: Synthetic Minority Over-sampling Technique // JAIR. AI Access Foundation, 2002. Vol. 16. P. 321–357.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-8

ALPHAFOLD 3-BASED STRUCTURAL ANNOTATION OF HASEKI TICK VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEINS *

N. S. Radchenko, I. A. Osinkina, A. V. Gladysheva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ radchenko_ns@vector.nsc.ru

Abstract

Haseki tick virus (HSTV) nonstructural proteins were analyzed using AlphaFold 3 revealing structural similarity to *Orthoflavivirus*. NS3 helicase, NS3 protease, NS5 RNA-polymerase, and NS5 methyltransferase structures support taxonomic classification and antiviral drug development for this emerging tick-borne pathogen.

Haseki tick virus (HSTV) is a recently discovered tick-borne unclassified positive-sense single-stranded RNA virus first identified in blood sera from tick-bitten patients and Ixodes persulcatus ticks across Russian Federation regions in 2019 [1]. HSTV-infected patients exhibited fever and elevated temperature, suggesting pathogenic potential. Yet structural and functional data for HSTV proteins were lacking, impeding classification and drug development.

This study employed AlphaFold 3 neural network and bioinformatics approaches to predict tertiary structures and annotate functions of HSTV nonstructural proteins based on the principle that protein structure dictates molecular function [2]. The HSTV genome encodes an approximately 5100 amino acid polyprotein, and we analyzed the C-terminal nonstructural region containing essential viral replication machinery components.

Structural modeling identified four major nonstructural proteins with high confidence scores. HSTV NS3 protease (204 amino acids, 22 kDa, pLDDT 70.40) exhibited a catalytic triad topologically identical to *Orthoflavivirus* NS3 proteases, with highest structural similarity to Dengue virus 2 NS3 protease (TM score 0.79, RMSD 2.33 Å). The protein adopts dual β-barrel architecture with D1 and D2 domains connected by flexible linkers.

HSTV NS3 helicase (490 amino acids, 55 kDa, pLDDT 75.80) displayed superfamily 2 helicase architecture with three domains (D1-D3) and eight conserved structural motifs (I, Ia, II, III, IV, IVa, V, VI) essential for function. The protein showed highest structural similarity to Hepatitis C virus NS3 helicase (TM score 0.66, RMSD 3.46 Å). Biomolecular complex modeling with ATP and 50-nucleotide RNA confirmed functional RNA-binding capacity.

HSTV NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (711 amino acids, 82 kDa, pLDDT 87.41) adopted characteristic right-hand architecture with palm, finger, and thumb domains surrounding the active site. Highest structural similarity was observed with Dengue virus 2 NS5 RdRp (TM score 0.72, RMSD 3.26 Å). All catalytic motifs (A-G) were identified, which is critical for catalytic activity. The protein exhibited unique structural features including additional α-helices extending from the priming loop, potentially enhancing primer-independent polymerase function.

HSTV NS5 methyltransferase (MT) (231 amino acids, 26 kDa, pLDDT 71.10) showed classical α/β/α topology with highest structural similarity to *Pyrococcus horikoshii* MT (TM score 0.77, RMSD 3.02 Å). Notably, this domain was separated from NS5 RdRp by an unknown 323 amino acid domain (NS5-X), unusual for *Orthoflavivirus* genus members where MT and RdRp form continuous NS5 protein. Complex modeling revealed that NS5-X adopts structured conformation only when associated with both MT and RdRp domains, potentially representing novel functional arrangement for RNA capping machinery.

An analysis of the HSTV polyprotein also identified two putative transmembrane proteins, NSTR1 and NSTR2, each containing four membrane-spanning helices. However, we were unable to generate reliable tertiary models for NSTR1 and NSTR2 using AlphaFold 3, leaving their three-dimensional organization unresolved.

Structural alignments consistently showed highest similarity to *Orthoflavivirus* proteins, despite extremely low amino acid sequence identity below 30 percent. This structural conservation suggests evolutionary relationship and supports potential taxonomic classification of HSTV within *Orthoflavivirus* genus.

The identified structural similarities provide foundation for rational drug design targeting HSTV replication machinery. Conserved active sites in NS3 protease and helicase, along with NS5 polymerase catalytic center, represent potential therapeutic targets. Additionally, structural models enable development of diagnostic assays and vaccine antigens for this emerging tick-borne pathogen.

* The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement #075-15-2025-452).

© N. S. Radchenko, I. A. Osinkina, A. V. Gladysheva, 2025

These findings demonstrate AlphaFold 3 capabilities for functional annotation of non-homologous viral genomes, revealing hidden structural relationships despite sequence divergence. Understanding HSTV structural biology is vital for readiness against emerging viral threats.

References

1. Kartashov M. Y., Gladysheva A. V., Shvalov A. N. et al. Novel Flavi-like virus in ixodid ticks and patients in Russia // Ticks Tick Borne Dis. 2023.

2. Gladysheva A. V., Osinkina I. A., Radchenko N. S. et al. Tertiary Structures of Haseki Tick Virus Nonstructural Proteins Are Similar to Those of Orthoflaviviruses // Int. J. Mol. Sci. 2024.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-9

MOLECULAR DOCKING OF FLAVONOIDS ISORHAMNETIN AND MYRICETIN WITH PARKINSON'S-RELATED TARGETS

M. V. Statsi, S. N. Shahab, A. V. Stasiuk

International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk

✉ nik.dragomirov@yandex.ru

Abstract

The present *in silico* investigation highlights the potential of two naturally occurring flavonoids, Isorhamnetin and Myricetin, as biologically relevant ligands interacting with target proteins associated with cellular stress regulation and neurodegenerative processes in Parkinson's disease (PD). Using molecular docking approaches, their affinity toward cyclin-dependent kinase 2 (CDK2; PDB ID: 3LFN) and DJ-1 (PDB ID: 1P5F) was systematically explored.

This study provides computational evidence that the flavonoids Isorhamnetin and Myricetin demonstrate favorable binding affinities with two proteins implicated in oxidative stress regulation and neurodegenerative pathways relevant to Parkinson's disease: cyclin-dependent kinase 2 (CDK2; PDB ID: 3LFN) and DJ-1 (PDB ID: 1P5F). Molecular docking analyses conducted in 5 independent sessions revealed that both ligands form stable complexes with these targets.

The 3D crystal structures of DJ-1 (PDB ID: 1P5F) and CDK2 (PDB ID: 3LFN) were retrieved from the RCSB Protein Data Bank. Ligand structures of Isorhamnetin and Myricetin were obtained from PubChem. Molecular docking with optimized proteins was performed in UCSF Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera) using AutoDock Vina. Results were analyzed with BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.5.

Both Isorhamnetin and Myricetin exhibited stronger interactions with CDK2, achieving docking scores of −8.1 (fig. 1), indicative of energetically stable and potentially functionally relevant binding.

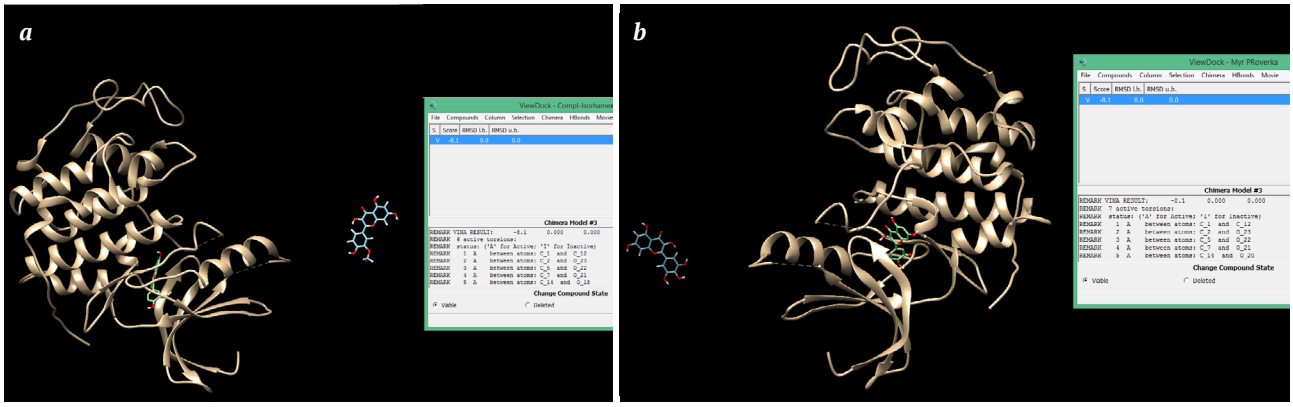


Fig. 1. Isorhamnetin (*a*) and Myricetin (*b*) achieving docking scores of −8.1 with CDK2 (PDB ID: 3LFN)

The interactions with DJ-1 were also notable (fig. 2), yielding docking scores of −6.6 for Isorhamnetin and −6.5 for Myricetin, suggesting a moderate but potentially biologically meaningful binding capacity that could influence DJ-1's redox-regulatory functions under oxidative stress conditions.

Regarding DJ-1 (ID:1P5F), a protein well-characterized for its neuroprotective functions under oxidative stress, both ligands exhibited moderate but notable binding affinities. Isorhamnetin docked with a score of −6.6, and Myricetin with −6.5. Given DJ-1's role as a multifunctional oxidative stress sensor and chaperone protein, these interactions may contribute to enhanced structural stability or functional modulation of the protein under pathological conditions.

The dual-target affinity of these compounds supports a multi-target therapeutic hypothesis in the context of PD. By simultaneously engaging proteins involved in oxidative stress regulation (DJ-1) and cell cycle/apoptotic pathways (CDK2), Isorhamnetin and Myricetin may offer a synergistic mechanism of neuroprotection. This is particularly rele-

© M. V. Statsi, S. N. Shahab, A. V. Stasiuk, 2025

vant for the development of disease-modifying strategies that go beyond symptomatic relief to address core pathogenic mechanisms.

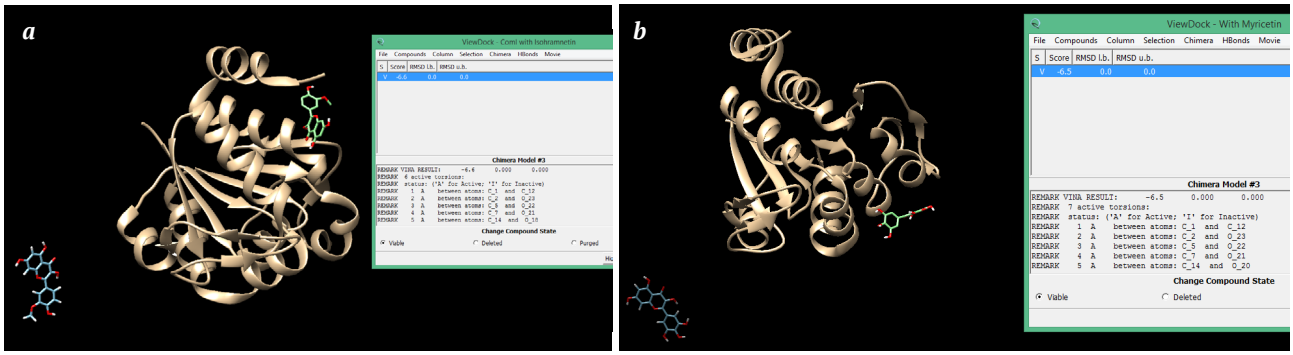


Fig. 2. Isorhamnetin (*a*) and Myricetin (*b*) achieving docking scores of –6.6 and –6.5 with DJ-1 (PDB ID: 1P5F)

Furthermore, both flavonoids are known for their antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties in various experimental models. Their plant-derived origin and documented bioactivity strengthen the rationale for repurposing them as lead compounds in neurodegenerative research pipelines. Taken together, this study reinforces the value of *in silico* docking as a preliminary screening tool to identify phytochemicals with therapeutic potential against PD.

In conclusion, the docking profiles of Isorhamnetin and Myricetin suggest that they are promising candidates for further research as potential multi-target therapeutic agents for the prevention or attenuation of Parkinson's disease progression.

References

1. Statsi M., Shahab S. Myricetin as a perspective ligand for binding 3LFN protein of Parkinson's disease // Conference Paper. 2023.

2. Shahab S., Kumar R., Sheikhi M. et al. Synthesis, modeling, bioactivity, docking, binding energy analysis of new effective piperazine derivatives as effective drug candidates for treatment of Parkinson's disease // Analytical Chemistry Letters. 2024. Vol. 14 (5). P. 638–653.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-10

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ *ACINETOBACTER BAUMANNII*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ИНФЕКЦИОННОМ ГОСПИТАЛЕ: ПОЛНОГЕНОМНОЕ MLST- И CGMLST-ТИПИРОВАНИЕ*

BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE GENOMIC VARIABILITY OF *ACINETOBACTER BAUMANNII* STRAINS CIRCULATING IN AN INFECTIOUS DISEASES HOSPITAL: WHOLE-GENOME MLST AND CGMLST TYPING

Д. Д. Авдюнин, С. С. Смирнова

Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург

D. D. Avdyunin, S. S. Smirnova

Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome", Yekaterinburg

✉ Avdyunin_dd@niivirom.ru

Аннотация

Проведен полногеномный анализ 19 изолятов *Acinetobacter baumannii* из инфекционного госпиталя для больных COVID-19. Выявлена полная идентичность 16S рРНК и MLST-генов при значительной гетерогенности cgMLST (24–583 различия). Обнаружен синонимичный SNP (T2220G) в *rpoB*, не описанный в базах данных. Результаты подчеркивают необходимость сочетания классических и полногеномных методов диагностики для осуществления качественного эпидемиологического надзора за ИСМП.

Abstract

A whole-genome analysis was performed on 19 *Acinetobacter baumannii* isolates from a COVID-19 infectious disease hospital. Complete identity of 16S rRNA and MLST genes was revealed, alongside significant cgMLST heterogeneity (24–583 allele differences). A synonymous SNP (T2220G) in *rpoB*, not previously reported in databases, was identified. The results highlight the need to combine classical and whole-genome diagnostic methods for effective epidemiological surveillance of healthcare-associated infections.

Род *Acinetobacter* объединяет грамотрицательные коккобациллы, типично функционирующие как комменсалы в экологических нишах, с широким распространением в водных и почвенных средах [1, 2]. Однако отдельные виды, особенно *A. baumannii*, эволюционировали в оппортунистические патогены, вызывающие нозокомиальные инфекции (бактериемии, поражения респираторного тракта, раневые инфекции), став ведущими госпитальными агентами [1, 2].

Классическая схема мультилокусного типирования (MLST), основанная на ограниченном наборе генов «домашнего хозяйства» (5–7 генов), также демонстрирует ограничения в отражении микроэволюционных процессов у генетически пластичных видов, таких как *A. baumannii* [3]. В этой связи методы полногеномного секвенирования (wgMLST, cgMLST) приобретают статус золотого стандарта, обеспечивая детекцию накопленных точечных мутаций в консервативных геномах, что критически важно для выявления клональной динамики и отслеживания путей передачи ИСМП. Особое значение это имеет для сформировавшихся госпитальных штаммов, характеризующихся длительной циркуляцией в условиях интенсивной селективной нагрузки [3]. Актуальность применения высокоразрешающих методов возрастает в контексте циркуляции возбудителя в период пандемии COVID-19, когда повышенная антимикробная нагрузка потенциально могла ускорить микроэволюцию внутрибольничных клонов.

Материалы и методы

Методом полногеномного секвенирования (Illumina MiSeq) получены 19 последовательностей *A. baumannii* от пациентов, с объектов среды и СИЗ персонала (2022–2023 гг., COVID-госпиталь). Проведен биоинформационный анализ: MLST (PubMLST), аннотирование (NCBI), SNP-анализ (MEGA X).

* Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Изучение эпидемического процесса и профилактика вирусных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (на примере ветряной оспы, норо- и ротавирусной инфекции и др.)». Рег. № НИОКТР 121040500099-5.

© Д. Д. Авдюнин, С. С. Смирнова, 2025

Результаты

Проанализированы: 16S рРНК, полные гены «домашнего хозяйства»*: cpn60* (*groL*), *fusA, gltA, pyrG* (*CTP synthase*), *recA, rplB, rpoB; cgMLST* (*2133 локуса*). Все изоляты *A. baumannii* отнесены к ST2, полная идентичность 16S рРНК (дистанция 0,0000). В генах MLST (типирующие зоны) SNP не выявлено (полная идентичность референсу). Однако в полном гене *rpoB* изолята 188-II_S28 обнаружена уникальная синонимичная замена, не изменяющая аминокислоту — T2220G (отсутствует в NCBI). Анализ cgMLST выявил значительную гетерогенность изолятов (см. таблицу).

Сравнительный анализ изолятов *A. baumannii* по схеме cgMLST

Sample ID	Closest cgST	Mismatches, n	Loci matched, %
6-531-2-III_S5	1746	24	98,9
108-2-III_S9	1746	110	94,8
50-2-III_S11	1746	115	95,6
61-II_S53	1746	115	94,6
72-III_S10	1746	117	94,5
42-III_S7	1746	121	94,3
26-III_S22	1746	129	94,0
55-II_S52	1746	138	93,5
19-II_S16	1746	156	92,7
27-III_S34	1746	171	92,0
346-II_S33	1746	186	91,3
63-II_S54	1746	202	90,5
44-2-III_S6	1746	211	90,1
4-II_S19	1746	222	89,6
69-II_S57	1746	228	89,3
198-II_S29	1746	232	89,1
100-II_S24	1746	258	87,9
104-II_S26	1746, 11006	461	78,4
188-II_S28	1746	583	72,7

Изолят 188-II_S28 (макс. mismatches = 583) одновременно содержал уникальный SNP в *rpoB*, что может указывать на его ускоренную эволюцию. Распределение mismatches не коррелировало со временем и динамикой отбора проб в госпитале.

Обсуждение

Обнаружение уникального синонимичного SNP в *rpoB* подтверждает недостаточную чувствительность классического MLST к микроэволюции. Идентичность 16S рРНК и генов MLST указывает на принадлежность изолятов к единому госпитальному клону (ST2). Выявленная гетерогенность cgMLST (до 583 различий) при сохранении ближайшего cgST (1746) характерна для длительно циркулирующих в условиях стационара популяций и объясняется высокой геномной пластичностью *A. baumannii*. Это подчеркивает необходимость интеграции полногеномных методов в систему эпидемиологического надзора за ИСМП.

Выводы

Геномный анализ выявил стабильность консервативных маркеров (16S рРНК, MLST) и гетерогенность в некоторых полных генах (cgMLST, *rpoB*), критичную для отслеживания вспышек. Популяция *A. baumannii* в инфекционном госпитале оставалась клонально связанной (ST2) на протяжении всего периода исследования, несмотря на вариабельность cgMLCT, что подтверждает высокую пластичность ее генома.

Литература

1. Wen H., Wang K., Liu Y. et al. Population dynamics of an Acinetobacter baumannii clonal complex during colonization of patients // Clin. Microbiol. 2014. Vol. 52 (9). P. 3200–3208.

2. Roca I., Espinal P., Vila-Farrés X., Vila J. The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace // Front. Microbiol. 2012. Vol. 3. P. 148.

3. Park S., Ryoo N. Comparative analysis of IR-Biotyper, MLST, cgMLST, and WGS for clustering of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a neonatal intensive care unit // Microbiol. Spectr. 2024. Vol. 12 (4). P. e0411923.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-11

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДОМЕН B3, В РАСТЕНИИ *NICOTIANA BENTHAMIANA* И АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ИХ ГЕНОВ *

GENOME-WIDE IDENTIFICATION AND EXPRESSION PROFILE ANALYSIS OF *NICOTIANA BENTHAMIANA* PLANT GENES ENCODING B3 DOMAIN-CONTAINING PROTEINS

А. Р. Алимова[1,2], Я. Ю. Савченко[3], Н. М. Ершова[1], К. А. Камарова[1], Е. В. Шешукова[1], Т. В. Комарова[1,2]

[1] *Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3] *Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*

A. R. Alimova[1,2], Ya. Yu. Savchenko[3], N. M. Ershova[1], K. A. Kamarova[1], E. V. Sheshukova[1], T. V. Komarova[1,2]

[1] *Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*
[3] *I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ alfiya_2000@mail.ru

Аннотация

Регуляция экспрессии генов осуществляется на транскрипционном уровне с помощью специальных белков — транскрипционных факторов (ТФ), взаимодействующих с ДНК. Семейство ТФ, которые содержат ДНК-связывающий домен B3, является специфичным для растений. Эти ТФ участвуют в процессах роста, развития и в формировании защитного ответа на стресс. С помощью биоинформатического анализа были изучены гены, кодирующие ТФ с доменом B3, в растениях *Nicotiana benthamiana*.

Abstract

Transcription factors (TFs) are special proteins that interact with DNA and regulate gene expression at the transcriptional level. Superfamily of B3 DNA-binding domain-containing TFs is plant-specific. These TFs are involved in the growth, development processes and formation of responses to stress. Genes coding B3 domain-containing TF in *Nicotiana benthamiana* plants were studied using bioinformatical analysis.

Для нормального роста и развития, а также для формирования защитных реакций против стрессовых воздействий растения используют различные механизмы. Одним из таких механизмов является регуляция транскрипции генов, отвечающих за данные процессы. Особые белки, транскрипционные факторы (ТФ), способны «узнавать» регуляторные последовательностями ДНК и связываться с ними с помощью ДНК-связывающего домена, тем самым запуская или (реже) ингибируя транскрипцию целевых генов. Одни ТФ также могут связывать другие ТФ и определенные молекулы (коактиваторы или корепрессоры) или привлекать различные клеточные машинерии для регуляции экспрессии генов.

Семейство ТФ, которые содержат ДНК-связывающий B3-домен, специфично для растений. Оно подразделяется на пять подсемейств, выполняющих различные функции: ARF (auxin response factors), RAV (related to ABI3/VP1), LAV (leafy cotyledon2 [LEC2]-abscisic acid insensitive [ABI3]- VIVIPAROUS-1/abscisic acid insensitive 3-like [VAL]) и REM (reproductive meristem). Представители этого семейства ТФ играют важную роль в процессе формирования отдельных органов растений, синтезе фитогормонов, а также участвуют в сигнальных путях и в защите растений от абиотических стрессов (недостатка влаги, повышенного содержания солей, экстремальных температур, повышенной освещенности) [1].

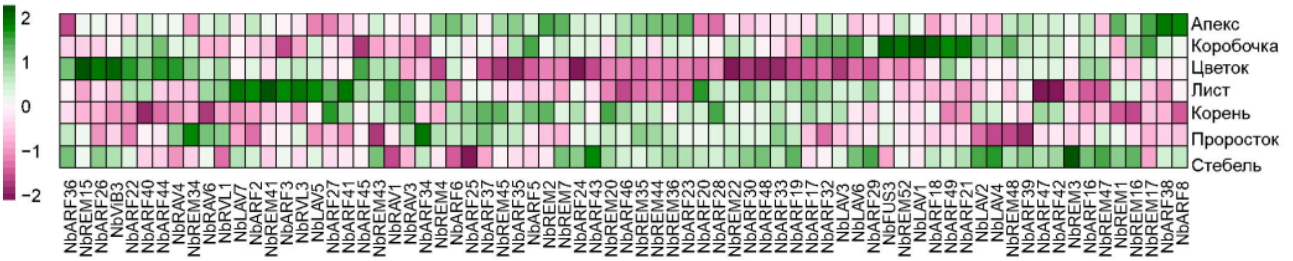
Nicotiana benthamiana является модельным организмом для изучения различных биологических процессов, в том числе механизмов устойчивости к стрессовым воздействиям и к вирусной инфекции. Однако нет данных о его генах, кодирующих белки, содержащие домен B3, и их роли в ответах на биотические стрессы. Целью настоящей работы является поиск, идентификация и характеристика генов, кодирующих белки с доменом B3, и анализ их профиля экспрессии.

В геноме *N. benthamiana*, полученном из базы данных SolGenomics [2], с помощью биоинформатического инструмента HMMER и сравнительного анализа были идентифицированы гены (91), кодирующие белки, содер-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИОГен РАН.

© А. Р. Алимова, Я. Ю. Савченко, Н. М. Ершова, К. А. Камарова, Е. В. Шешукова, Т. В. Комарова, 2025

жащие домен(ы) B3. Эти белки были классифицированы на четыре подсемейства на основе их филогенетических связей, а именно: ARF, RAV, LAV и REM. Реконструкция филогении была проведена на основе множественного выравнивания нуклеотидных или белковых последовательностей с использованием алгоритма FastTree [3], включающего метод «объединения соседей» (англ. Neighbor-Joining). Полученные транскриптомные данные из базы данных NCBI SRA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra, SRA ID: SRP018508) были предобработаны с помощью биоинформатических инструментов FastQC и Trimmomatic. Затем производилось картирование на референсный геном с помощью TopHat2, оценка уровня экспрессии с помощью HTSeq-count и анализ дифференциально экспрессирующихся генов с помощью пакета edgeR на языке R. В ходе анализа транскриптомных данных из органов растения обнаружено, что, например, повышенная экспрессия 30 генов необходима для роста и развития листьев растений, а экспрессия 45 генов снижена в цветках (см. рисунок).



Анализ уровня экспрессии генов *N. benthamiana*, кодирующих содержащие домен(ы) B3 белки в различных органах. *Темно-зеленый цвет* отражает повышенную экспрессию, *темно-лиловый цвет* — сниженную

Дополнительно был проведен поиск дифференциально экспрессирующихся генов в листьях при нормальных условиях и в условиях абиотического стресса (засуха), в результате которого было выявлено 16 генов. С помощью веб-сервисов WoLF PSORT (https://www.genscript.com/wolf-psort.html) и DeepLoc (https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.1/) была предсказана субклеточная локализация белков: 86 белков локализованы в ядре, 1 белок — в цитоплазме, 2 белка — в цитоплазме/ядре, 1 белок — в хлоропласте/ядре и 1 белок — в хлоропласте/митохондрии. Однако результаты предсказания требуют экспериментального подтверждения.

На основании проведенного анализа были сделаны следующие выводы: 1) геном *N. benthamiana* кодирует 91 белок, содержащий домен(ы) B3; 2) предсказанные белки подразделяются на 4 подсемейства: ARF (39), RAV (10), LAV (8) и REM (34); 3) экспрессия 16 генов семейства повышается в листьях при наступлении абиотического стресса (засуха); 4) 86 белков из 91, предположительно, имеют ядерную локализацию.

Таким образом, в *N. benthamiana* были идентифицированы гены, кодирующие белки семейства ТФ, содержащие домен B3. Был охарактеризован их профиль экспрессии в различных органах растения и в ответ на абиотический стресс, а также предсказана субклеточная локализация кодируемых белков.

Литература

1. Swaminathan K. et al. The plant B3 superfamily // Trends in Plant Science. 2008. Vol. 13, No. 12. P. 647–655.

2. Fernandez-Pozo N. The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding // Nucleic Acids Research. 2015. Vol. 43, No. D1. P. D1036–D1041.

3. Price M. N. et al. FastTree 2 — Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments // Plos One. 2010. Vol. 5, No. 3. P. e9490.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-12

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ В ПАНГЕНОМЕ БАКТЕРИЙ, НЕСУЩИХ ГЕН *LUXR* *

ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF METABOLIC PATHWAYS IN THE PANGENOME OF BACTERIA CARRYING THE *LUXR* GENE

В. Б. Виниченко[1], К. С. Согомонян[1], Ф. М. Шматов[1,2], Л. Г. Данилов[1], К. С. Антонец[1,2]

[1] *Санкт-Петербургский государственный университет*
[2] *Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*

V. B. Vinichenko[1], K. S. Sogomonian[1], F. M. Shmatov[1,2], L. G. Danilov[1], K. S. Antonets[1,2]

[1] *Saint Petersburg State University*
[2] *All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg*

✉ vinichenko.nika@yandex.ru

Аннотация

Кворум-сенсинг регулирует вирулентность бактерий через белок LuxR. Проанализированы 3358 бактериальных геномов из NCBI RefSeq с проверкой качества и выявлением генов *luxR*. Обнаружено различие в метаболических путях между геномами с *luxR* и без него, что указывает на роль *luxR* в регуляции метаболизма и кворум-сенсинга.

Abstract

Quorum sensing regulates bacterial virulence through the LuxR protein. A total of 3,358 bacterial genomes from NCBI RefSeq were analyzed with quality control and identification of *luxR* genes. Differences in metabolic pathways were found between genomes with and without *luxR*, indicating the role of *luxR* in metabolism regulation and quorum sensing.

Кворум-сенсинг — это система регуляции экспрессии генов бактерий, которая отвечает за ключевые факторы вирулентности, включая формирование биопленок и секрецию токсинов. Исследования метаболизма бактерий позволяет изучить биохимические процессы, осуществляющие регуляцию работы кворум-сенсинга, что может быть использовано для подавления развития и снижения вирулентности патогенных бактерий.

Ген *luxR*, кодирующий одноименный белок LuxR, играющий центральную роль в регуляции экспрессии генов посредством системы кворум-сенсинга [1], был выбран в качестве объекта для дальнейшего изучения.

Нами были выгружены геномные последовательности всех бактерий, представленных в открытой базе данных NCBI RefSeq Assembly (на 09.04.2025), после чего для обеспечения надежности дальнейшего анализа был проведен многоэтапный контроль качества. Сначала была выполнена фильтрация датасета на основе характеристик, указанных в NCBI, включая статус Assembly level “Complete Genome”, представленность генов по CheckM (версия: 1.2.3) не менее 97,5 %, а также подтверждение принадлежности организмов к царству бактерий (NCBI TaxID: 2).

Для оценки качества геномных сборок использовалась программа QUAST (версия: 5.3.0), которая позволила определить ключевые параметры: N50 — показатель непрерывности сборки, отражающий длину контига, при достижении суммарной длины которого достигается половина общей длины генома; GC-состав, важный для выявления возможных ошибок секвенирования или контаминации; общую длину генома и количество контигов. Дополнительно с помощью программы BUSCO (версия: 5.8.3) была проведена оценка качества аннотации, включающая определение числа потенциально кодирующих участков (CDS) и полноты сборки геномов на основе сравнения с бактериальным набором данных из базы OrthoDB версии 12.0. Для фильтрации геномных сборок были установлены следующие критерии качества: значение N50 должно составлять не менее 90 % от общей длины собранного генома, количество кодирующих генов — не менее 500, а полнота сборки по BUSCO — не ниже 85 %.

В результате фильтрации было оставлено 3358 геномов. Поскольку белок LuxR характеризуется наличием С-концевого ДНК-связывающего (идентификатор PFA: PF00196) и N-концевого аутоиндуктор-связывающего доменов (идентификатор PFA: PF03472), в этих геномных сборках с помощью программы HMMER (версия: 3.4)

* Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Изучение генетических основ внутривидовой изменчивости, надорганизменных взаимодействий и таксономического разнообразия с использованием биоресурсных коллекций» (шифр 124032000041-1).

© В. Б. Виниченко, К. С. Согомонян, Ф. М. Шматов, Л. Г. Данилов, К. С. Антонец, 2025

проводилась проверка наличия генов, кодирующих белки с обоими доменами LuxR. В отфильтрованном датасете выявлено, что 1838 геномов содержат белки с сохраненным С-концевым доменом, 1317 — гены, кодирующие белки с обоими доменами LuxR, и 203 генома не содержат генов, кодирующих белки с доменами LuxR. Для оценки аннотации метаболических путей использовалась программа GapSeq (версия: 1.3.1).

Среднее количество метаболических путей на геном составило 3,1 тысячи для всех исследуемых групп. Число полноценных метаболических путей, общих для всех геномов в каждой группе, составило 5 для геномов с *luxR* (из которых 1 — с белками, содержащими только С-домен, и 4 — с белками, обладающими обоими доменами) и 14 для геномов без *luxR*. Из 12 тысяч реакций, выявленных в геномах с luxR, лишь 4 реакции были закодированы во всех исследуемых геномах (2 — в геномах с белками, содержащими только С-домен, и 2 — с белками, обладающими обоими доменами), тогда как в геномах без *luxR* таких реакций оказалось 191.

Наличие гена *luxR*, вероятно, указывает на его возможную роль в регуляции метаболических процессов. В условиях экспрессии данного гена могут активироваться дополнительные метаболические пути, которые, возможно, функционируют как регуляторные системы для *luxR*, либо наоборот — участвуют в синтезе лигандов, необходимых для сигнальной активности. Полученные результаты будут использованы для дальнейшего анализа регуляции кворум-сенсинга.

Литература

1. Rajput A., Kumar M. In silico analyses of conservational, functional and phylogenetic distribution of the LuxI and LuxR homologs in Gram-positive bacteria // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. Art. 6969. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-017-07241-5.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-13

NUCLEPHASER: ГЛУБОКОЕ ОБУЧЕНИЕ ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОГО МОНИТОРИНГА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *

NUCLEPHASER: DEEP LEARNING FOR REAL-TIME CELL POPULATIONS MONITORING

Н. С. Волошин[1], Е. В. Путляев[1,2], Е. С. Чечехина[1], В. А. Усачёв[1], М. Н. Карагяур[1], К. Д. Бозов[1], О. А. Григорьева[1], П. А. Тюрин-Кузьмин[1], К. Ю. Кулебякин[1]

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

N. S. Voloshin[1], E. V. Putlyaev[1,2], E. S. Chechekhina[1], V. A. Usachev[1], M. N. Karagyaur[1], K. D. Bozov[1], O. A. Grigorieva[1], P. A. Tyurin-Kuzmin[1], K. Y. Kulebyakin[1]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow*

✉ voloshinns@my.msu.ru

Аннотация

NuclePhaser — инструмент обнаружения ядер клеток на микроскопных изображениях в проходящем свете. С его помощью возможно без фиксации и окрашивания оценить скорость роста клеточной популяции или автоматически отследить одиночные клетки. Преимуществом метода является быстрая калибровка и оценка точности на конкретных изображениях. NuclePhaser опубликован в открытом доступе в формате плагина к Napari (https://github.com/nikvo1/napari-nuclephaser).

Abstract

NuclePhaser is a tool for detecting cell nuclei on brightfield microscopic images. With its help, it is possible to estimate the growth rate of a cell population without fixation and staining, or to automatically track single cells. The advantage of this method is the rapid calibration and evaluation of accuracy on specific images. NuclePhaser is an open-source tool published in the format of a plugin to Napari (https://github.com/nikvo1/napari-nuclephaser).

Микроскопия является широко распространенным подходом в биологических исследованиях. Однако большинство методов микроскопии требуют фиксации или окрашивания образцов, что может нарушить динамику клеточных процессов и повлиять на результаты эксперимента. В свою очередь, микроскопия в проходящем свете (например, фазово-контрастная микроскопия) позволяет наблюдать за клетками с минимальным внешним воздействием, однако она создает изображения с низким контрастом, которые затруднительно анализировать автоматически.

Для решения этой проблемы создана система NuclePhaser, основанная на алгоритмах обнаружения объектов YOLO. Модели NuclePhaser детектируют клеточные ядра на микроскопных изображениях в проходящем свете, что позволяет решать такие задачи, как мониторинг роста клеточной популяции или автоматический трекинг одиночных клеток.

Для обучения моделей был создан обширный датасет, включающий более 100 000 изображений размером 640 × 640 пикселей и более 3 миллионов размеченных ядер. Большое количество изображений было получено с помощью вспомогательной модели обнаружения ядер на изображениях с флуоресцентной окраской, которая позволила автоматически разметить данные. Датасет охватывает четыре типа клеточных культур: CHO, HEK293, иПСК и МСК. Для повышения генерализации моделей были использованы различные условия съемки (разные микроскопы, камеры, увеличения) и аугментации, имитирующие различные настройки и артефакты микроскопа (неидеальный фокус, шум, изменяющееся освещение и др.)

С помощью полученного большого датасета были обучены модели YOLOv5 и YOLOv11. Лучшие показатели продемонстрировала модель YOLOv5l: mAP 0.5 — 0,8776, максимальный F1 — 0,8349, precision при максимальном F1 — 0,8732, recall при максимальном F1 — 0,7998.

Важным параметром применения моделей обнаружения объектов является порог достоверности (confidence threshold), от которого напрямую зависит, сколько объектов на изображении будет обнаружено. Мы разработали

* Исследование выполнено при поддержке Некоммерческого фонда поддержки науки и образования «Интеллект».

© Н. С. Волошин, Е. В. Путляев, Е. С. Чечехина, В. А. Усачёв, М. Н. Карагяур, К. Д. Бозов, О. А. Григорьева, П. А. Тюрин-Кузьмин, К. Ю. Кулебякин, 2025

несколько вариантов алгоритмов калибровки данного параметра, с помощью которого можно подстраивать модели под конкретный набор изображений. При наличии большого размеченного изображения возможно также оценить точность модели после калибровки, что позволяет быть уверенным при использовании алгоритма на конкретном наборе данных.

Для проверки того, как модели справляются на реальных данных, мы использовали датасет LIVECell, состоящий из изображений 8 типов клеток, отличающихся от клеток в обучающем датасете и снятых на другом микроскопе. Мы протестировали способность моделей определять количество клеток на изображении, что используется при решении задачи оценки скорости роста клеточной популяции. Минимальная точность (определенная как 100 — средняя абсолютная процентная ошибка) среди 8 типов клеток составила 85,1 %, в то время как для клеток SK-BR-3 точность составила 96,9 %.

Мы также проверили, как модели справляются с трекингом одиночных клеток при помощи датасетов CellTrackingChallenge. На датасетах с фазово-контрастными изображениями клеток U373 в 3 из 4 фильмах достигнута точность трекинга 100 %, в то время как в оставшемся фильме точность составила 71,43 %.

Для повышения доступности наших разработок для широкого круга пользователей мы опубликовали NuclePhaser в формате плагина для Napari (https://github.com/nikvo1/napari-nuclephaser). В нем исследователи могут применить обученные модели к своим изображениям без использования кода, а также откалибровать и оценить точность моделей с использованием готовых алгоритмов.

Основными преимуществами NuclePhaser являются:

– способность применения к изображениям любого размера (за счет использования методов sliced inference);

– возможность калибровки и оценки точности на конкретных случаях;

– высокая генерализация за счет использования различных клеток и условий съемки на этапе создания датасета, а также аугментаций на этапе обучения моделей;

– высокая скорость работы без использования графических процессоров.

Таким образом, NuclePhaser (https://github.com/nikvo1/napari-nuclephaser) — удобный и надежный инструмент, позволяющий решать задачи мониторинга клеточных популяций по изображениям микроскопии в проходящем свете.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-14

ОПТИМИЗАЦИЯ ДАННЫХ В БИОИНФОРМАТИКЕ

DATA OPTIMISATION IN BIOINFORMATICS

Р. З. Габбасов, Г. Т. Закирьянова, С. И. Хажина

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

R. Z. Gabbasov, G. T. Zakiryanova, S. I. Khazhina

Bashkir State Medical University, Ufa

✉ vessel228@yandex.ru

Аннотация

Современная биомедицина столкнулась с беспрецедентным ростом объемов данных, требующих обработки: от полногеномного секвенирования до сложных медицинских изображений. По данным NIH, ежегодный прирост геномной информации составляет до 40 экзабайт, при этом значительная часть этих данных остается неструктурированной и неиспользованной, что обусловлено множеством факторов.

Abstract

Modern biomedicine is faced with an unprecedented increase in data volumes that require processing, from genome-wide sequencing to complex medical images. According to the NIH, the annual increase in genomic information is up to 40 exabytes, while a significant part of this data remains unstructured and unused, due to many factors.

Биоинформатика — одна из самых динамических наук в наше время. В условиях стремительного роста объемов геномной информации, развития высокопроизводительного секвенирования и появления новых экспериментальных технологий актуальность методов оптимизации становится особенно очевидной. Нелинейность, высокая структурная и морфологическая сложность моделей на фоне общего роста слабоструктурированной исходной информации и относительного роста ее нечеткости приводят к необходимости предварительного преобразования и интеграции данных. Современные исследования требуют не только обработки колоссальных массивов данных, но и обеспечения высокой точности, скорости и интерпретируемости результатов.

Стохастические методы оптимизации (SDG) являются основными для обучения крупных моделей на больших данных в совокупности с обновлением параметров на мини-батчах и возможностью параллелизации, именно поэтому данные алгоритмы в докинге и предсказании 3D-структур белков.

Активно применяются распределенные алгоритмы в оптимизации данных. В проекте 1000 Genomes оптимизированный алгоритм выравнивания позволяет анализировать 2500 геномов одновременно, при этом обрабатывая 200 ГБ данных за 3 часа вместо 24. В криминалистике пользуется успехом SPR Opt, оптимизирующий судебно-медицинские маркеры для получения максимального количества информации при минимальном количестве анализов. В качестве входных данных он принимает полную или частичную последовательность генома.

В условиях работы с неразмеченным данными крайне эффективно себя проявляет обучение без надзора (Unsupervised learning), позволяя выявлять скрытые структуры и закономерности данных без необходимости ручной разметки. Условно можно выделить два основных метода: кластеризация и метод уменьшения данных. Кластеризация — процесс объединения информации в кластеры, используемый в биоинформатике для анализа генов, белков и других биомолекул. Она нашла применение в протеомике, структурной биологии, анализе биомаркеров и др. Наиболее известные алгоритмы включают k-means, DBSCAN и иерархическую кластеризацию. Метод понижения размерности позволяет сохранить наиболее важную информацию, уменьшив количество вводных данных.

Применение машинного обучения обширно. Расчет стабильности комплексов может быть оптимизирован за счет предсказания термодинамических параметров ДНК-белковых взаимодействий.

Несмотря на имеющиеся успехи, существуют проблемы, связанные с передачей данных, требующих возрастающих вычислительных мощностей. Возникают сложности с интерпретируемостью некоторых моделей и высоким уровнем шума, часто встречающимся в биологических экспериментах.

© Р. З. Габбасов, Г. Т. Закирьянова, С. И. Хажина, 2025

В результате проведенного анализа представлен обзор современных методов оптимизации данных в биоинформатике. Установлено, что применение усовершенствованных алгоритмов обработки геномной информации позволяет существенно повысить точность интерпретации биологических данных. Полученные результаты демонстрируют значительный потенциал для развития персонализированной медицины и оптимизации доклинических исследований за счет внедрения эффективных вычислительных решений.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-15

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА НА ОСНОВЕ РЕКУРРЕНТНЫХ И СВЕРТОЧНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

RECURRENT AND CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORKS FOR PROTEIN STRUCTURE PREDICTION

А. А. Головкин[1,2], А. В. Беспалов[1]

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

A. A. Golovkin[1,2], A. V. Bespalov[1]

[1] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ a.bespalov@alumni.nsu.ru

Аннотация

В данной работе описана разработка нейронной модели для предсказания структур белков на основе их первичной последовательности аминокислот. Разработанная модель показала высокую эффективность и статистическую достоверность с метриками Weighted PPV, Weighted SEN и F1-Score, равными 0,8901, 0,892 и 0,891 соответственно. Кроме того, значения AUC для каждого класса превысили 0,94, что свидетельствует о надежности и качестве модели.

Abstract

The proposed neural model has demonstrated effectiveness and statistical validity in predicting structures of single-chain polypeptides. This is supported by the metrics with weighted PPV, weighted sensitivity (SEN), and F1-score values of 0.8901, 0.892, and 0.891 respectively. Moreover, the AUC values for each class exceeded 0.94, further confirming the robustness of the model.

Белки представляют собой сложные биологически активные молекулы, состоящие из длинных цепочек аминокислотных остатков. Их структура организована на нескольких уровнях, каждый из которых имеет свои принципы организации, что позволяет воссоздать состояние белка на определенном этапе синтеза с помощью алгоритмов прогнозирования.

Исследование белков представляет значительный научный интерес благодаря их уникальным свойствам и широкому спектру применения. Особое внимание уделяется изучению фармакологических характеристик полипептидов и их роли в биологических процессах человека. Понимание структуры белков позволяет прогнозировать их физико-химические взаимодействия с другими молекулами, а также их функции в организме. Прогнозирование и моделирование белковых структур остаются актуальными задачами, и одним из наиболее эффективных методов их решения сегодня являются нейронные сети. Благодаря комбинации линейных и нелинейных вычислений успешно выявляются сложные взаимосвязи между архитектурой белков и их свойствами. Ключевое преимущество нейросетевых моделей — способность выявлять общие закономерности, применимые ко всей молекуле. Однако для решения различных задач требуется корректная подготовка входных данных. Поскольку белки обладают множеством свойств и конформаций, важным этапом становится выбор оптимального представления данных в зависимости от архитектуры модели и целевых результатов.

Современные алгоритмы предсказания вторичных структур белков, несмотря на их эффективность, имеют ряд ограничений: они могут содержать систематические погрешности и демонстрируют сниженную точность при отсутствии точных атомарных координат целевого белка.

В связи с этим разработка альтернативных подходов к прогнозированию вторичных структур сохраняет свою актуальность. В данной работе описывается создание статистически достоверной нейронной сети, способной с высокой точностью предсказывать вторичные структуры белков исключительно на основе их первичной аминокислотной последовательности.

Набор тестовых данных был создан из файлов, взятых из RCSB Protein Data Bank. При анализе использовались белки, состоящие из одной полипептидной цепочки с известным составом аминокислотных остатков на 70 % и более. В качестве выходных данных были представлены классы вторичных структур белков по системе

© А. А. Головкин, А. В. Беспалов, 2025

DSSP. Полученные последовательности аминокислотных остатков и вторичных структур переводились в численные значения в соответствии с заранее заготовленным словарем.

В описываемую модель данные поступали по 100 белков за одну итерацию. При поступлении входных значений, отражающих первичную структуру белка, первой стадией обработки служил слой Embedding, который создавал контекст и формировал векторное представление аминокислот. После формирования векторного представления матрица транспонировалась и проходила через следующий слой — одномерную свертку Conv1d, которая выделяла новые признаки. Затем матрица снова транспонировалась и подавалась на слой LSTM, выполняющий задачи долгосрочной краткосрочной памяти, что позволило учитывать зависимости в последовательности. На этом этапе каждый элемент данных проходил дальнейшую обработку с помощью специализированных функций. Результатом работы модели была матрица, содержащая вероятности принадлежности каждой аминокислоты к определенному классу вторичной структуры. Итоговый класс для каждого остатка определялся по максимальному значению вероятности. Обучение сети проводилось в течение 1000 эпох. В работе использовался алгоритм стохастического градиентного спуска (SGD) в качестве оптимизатора, а функцией потерь была выбранная NLLLoss. Для оценки качества модели строились ROC-кривые для каждого класса, а также рассчитывались статистические метрики: площадь под ROC-кривой (AUC), положительное прогностическое значение (PPV), чувствительность (SEN) и F1-мера (F1-Score).

В процессе обучения модель улучшила свою точность на тренировочной выборке с 0,8123 на первой эпохе до 0,8946 на тысячной. На тестовой выборке показатели точности были сопоставимы: 0,8110 при первой эпохе и 0,8925 при последней. Значение F1-Score составило 0,891, что высоко и близко к единице, указывая на хорошую способность модели точно предсказывать классы вторичных структур, снижая число ложных срабатываний и корректно выявляя истинные положительные случаи. Все рассчитанные метрики подтверждают, что нейронная сеть демонстрирует высокую и статистически значимую эффективность в предсказании вторичной структуры белков с одной полипептидной цепью на основе аминокислотных последовательностей.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-16

ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ МШАНОК К ПРЕСНОВОДНОЙ СРЕДЕ ОБИТАНИЯ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ RNA-SEQ-ЭКСПЕРИМЕНТОВ *

REVEALING MOLECULAR MECHANISMS OF BRYOZOAN ADAPTATION TO FRESHWATER HABITAT BASED ON RNA-SEQ EXPERIMENTS

Ю. А. Зайцева[1], Л. Г. Данилов[1], В. В. Старунов[2]

[1]*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*
[2]*Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург*

I. A. Zaitseva[1], L. G. Danilov[1], V. V. Starunov[2]

[1]*Sirius University of Science and Technology, Sochi*
[2]*Zoological Institute RAS, Saint Petersburg*

✉ yulia.zaitzeva674@yandex.ru

Аннотация

В работе проведен комплексный сравнительный анализ транскриптомных профилей и генных семейств морских и пресноводных мшанок. Выявлены биологические процессы, ассоциированные с переходом в пресноводную среду обитания, связанные с осморегуляцией, стресс-ответом, иммунной регуляцией, метаболизмом и симбиозом. Установлены таксоны, предположительно характерные для микробиоты пресноводных и морских видов мшанок.

Abstract

This study presents a comprehensive comparative analysis of transcriptomic profiles and gene families in marine and freshwater bryozoans. Biological processes associated with the transition to freshwater habitats related to osmoregulation, stress response, immune regulation, metabolism and symbiosis were identified. Taxa putatively characteristic of the microbiota of freshwater and marine bryozoan species have been identified.

Мшанки — колониальные эпибионты, широко распространенные в морских и пресноводных биотопах [1]. Несмотря на высокое видовое разнообразие и значительную экологическую роль в пресноводных и морских экосистемах [2], молекулярно-генетические особенности мшанок остаются недостаточно изученными. По сравнению с другими беспозвоночными, у представителей данного типа до сих пор отсутствуют полноценно описанные геномные и транскриптомные данные, что ограничивает возможности исследования их эволюционной биологии, симбиотических взаимодействий и стратегий адаптации. Переход от морской к пресноводной среде представляет собой значимое эволюционное событие, сопровождающееся комплексной физиологической и молекулярной перестройкой, механизмы которой активно изучаются с применением биоинформатических подходов.

В анализ были включены сырые данные четырех видов мшанок — двух пресноводных (*Fredericella sultana*, *Plumatella fungosa*) и двух морских (*Dendrobeania fruticosa*, *Eucratea loricata*), а также транскриптомные сборки из открытых источников, ранее опубликованные для других представителей данного типа. Для видов, чьи сборки отсутствовали в публичных базах, была выполнена *de novo* реконструкция транскриптомов на основе парных RNA-Seq-прочтений с использованием Trinity (v2.15.2). Предсказание и редукция белок-кодирующих последовательностей осуществлялись с помощью TransDecoder (v5.7.1) и CD-HIT (v4.8.1). Функциональная аннотация выполнялась несколькими базами данных.

Для всех видов были выделены общие ортогруппы с использованием OrthoFinder (v2.5.5). Филогенетический анализ и оценка времени дивергенции проводились на основе конкатенированной матрицы однокопийных ортогрупп, выровненных с помощью MAFFT (v.7.471). Построение филогенетического дерева выполнено методом максимального правдоподобия в IQ-TREE (v2.4.0), временные оценки получены с использованием MCMCTree на основе байесовского подхода. Изменения в размерах генных семейств оценивались в программе CAFE5 (v.1.1) на основе матрицы чисел копий транскриптов, что позволило выявить функциональные категории, демонстрирующие достоверное сокращение или расширение в пресноводных линиях. Таксономический состав микробиоты оценивался на основе транскриптомных данных с использованием инструмента Kaiju (v1.10.1) и базой данных refseq_nr. Для выявления таксонов, статистически обогащенных в морских и пресно-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 125012800894-6.
© Ю. А. Зайцева, Л. Г. Данилов, В. В. Старунов, 2025

водных формах, применялся дифференциальный анализ с помощью инструмента LEfSe (v1.1.2) (p-value < 0,01, LDA score > 2).

Филогенетический анализ и оценка времени дивергенции показали, что пресноводные мшанки отделились от морских форм в кембрийском периоде (~ 540 млн лет назад), что указывает на их независимое эволюционное развитие. В ходе анализа были выявлены функциональные категории генных семейств, потенциально связанные с адаптацией к пресноводной среде обитания, в том числе отвечающие за осморегуляцию, транспорт молекул и клеточные реакции на стресс. В частности, были обнаружены семейства, участвующие в поддержании внутриклеточного гомеостаза, включая процессы катаболизма нуклеотидов, транспорта анионов и аминокислот, а также механизмы клеточного ответа на такие стрессовые воздействия, как радиация, фолиевая кислота и окислительные повреждения. Таксономический анализ микробиоты выявил средоспецифичных бактериальных порядка *Gemmatales* [3] у пресноводных форм и *Vibrionales* [4] и *Alteromonadales* [5] — у морских, которые могут быть важными компонентами микробиома, влияющими на физиологическое состояние колонии в морских и пресноводных средах обитания.

Литература

1. Темерева Е. Н. Руководство для большого практикума по зоологии беспозвоночных: форониды и мшанки. Ч. 2. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2023. С. 84.

2. Gordon D. P. Kingdom Animalia: Radiata, Lophotrochozoa, Deuterostomia. Christchurch: Canterbury University Press. 2009. P. 528.

3. Kumar G., Eswarappa S. M., Okamura B., Hartikainen H. Gemmata algarum, a Novel Planctomycete Isolated from an Algal Mat, Displays Antimicrobial Activity // Marine Drugs. 2023. Vol. 22, No. 1. P. 10.

4. Radjasa O. K., Sabdono A., Junaidi, Trianto A., Sabdaningsih A. Bacterial symbionts of reef invertebrates: screening for anti-pathogenic bacteria activity // Biodiversity. 2013. Vol. 14, No. 2. P. 80–86.

5. Демидова М. А. и др. Идентификация и локализация симбиотических бактерий мшанки Patinella verrucaria (Cyclostomata) // Тр. XI Междунар. науч.-практ. конф. «Морские исследования и образование». М.: МГУ, 2022. С. 247–250.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-17

АНАЛИЗ *IN SILICO* ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМ МАТРИКСОМ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТЬЮ, ПРИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

IN SILICO ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILE FEATURES ASSOCIATED WITH EXTRACELLULAR MATRIX AND PHENOTYPIC PLASTICITY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER

М. Ю. Карпушин, Н. А. Шелепин, И. В. Балалаева

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

M. U. Karpushin, N. A. Shelepin, I. V. Balalaeva

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ carpushin.misha@yandex.ru

Аннотация

Цель работы — анализ *in silico* особенностей профиля экспрессии генов, ассоциированных с внеклеточным матриксом и фенотипической пластичностью, при трижды негативном раке молочной железы. С использованием набора данных GSE65194 из базы данных NCBI GEO показаны специфические изменения в экспрессии генов исследованной группы, что в перспективе может быть использовано при поиске новых терапевтических мишеней для ТНРМЖ.

Abstract

The aim of the work is to analyze in silico the features of the gene expression profile associated with the extracellular matrix and phenotypic plasticity in triple-negative breast cancer. Using the GSE65194 dataset from the NCBI GEO database, specific changes in gene expression of the studied group are shown, which in the future can be used in the search for new therapeutic targets for TNBC.

Введение

По данным литературы, на долю пациентов с раком молочной железы (РМЖ) приходится до 36 % онкологических больных [1]. Существует несколько молекулярных подтипов РМЖ: люминальный А, люминальный Б, HER2+, трижды негативный (ТНРМЖ) [2]. ТНРМЖ отличается отсутствием рецепторов эстрогена, прогестерона и рецептора HER2, высокой степенью агрессивности, склонностью к раннему метастазированию, низкой чувствительностью к иммунотерапии и гормональному лечению. Это обуславливает необходимость поиска новых молекулярных механизмов в качестве новых мишеней для терапии данного заболевания.

Особое внимание в рамках такого поиска представляет взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ). Многочисленными исследованиями установлено, что ВКМ активно участвует в регуляции поведения опухолевых клеток и играет ключевую роль в инвазии, ангиогенезе, метастазировании и резистентности к терапии [3–5].

Целью работы являлся анализ *in silico* особенностей экспрессии генов, ассоциированных с ВКМ и фенотипической пластичностью, при ТНРМЖ, а также их функциональная аннотация.

Методы

Для анализа использовался набор данных GSE65194 [6] из NCBI GEO [7], полученный на платформе Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array [8]. Набор данных содержит 178 образцов: ТНРМЖ (n = 41), HER2+ (n = 30), люминальный А (n = 29), люминальный Б (n = 29), клеточные линии РМЖ (n = 14), нормальные ткани, полученные в ходе маммопластики (n = 11). Нами использовались нормализированные данные в формате log2 значений уровня экспрессии генов.

Список генов интереса составлен с использованием The Matrisome Project [9], из которого получено 1027 генов, связанных с ВКМ, и MSigDB [10], из которого получено 250 генов, связанных с фенотипической пластичностью в количестве 250 генов. Итоговый список включал в себя 1027 генов. Из них в наборе данных обнаружено 943 гена, включенных в исследование.

© М. Ю. Карпушин, Н. А. Шелепин, И. В. Балалаева, 2025

Для анализа набора данных была разработана оригинальная программа АнДЭГ. С использованием программы проводился анализ дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) для каждого подтипа РМЖ в сравнении с нормальными тканями ($|\log2FC| > 1$, $p < 0{,}001$).

Для выявления генов, показавших изменение экспрессии только в образцах ТНРМЖ или во всех подтипах РМЖ, использовался веб-инструмент InteractiVenn [11].

Для биологической интерпретации изменений экспрессии генов интереса проводилось обогащение сигнальных путей ($p < 0{,}001$) из KEGG Pathway Database [12]. Обогащение проводилось отдельно для групп генов с повышенной и пониженной экспрессией с помощью программы АнДЭГ через обращение в REST API сервиса Enrichr [13, 14].

Результаты

Анализ показал, что все подтипы РМЖ демонстрируют значимые изменения в профиле экспрессии генов, ассоциированных с ВКМ и фенотипической пластичностью (см. таблицу).

Результаты анализа ДЭГ для подтипов РМЖ

Подтип РМЖ	Общее количество генов с изменившейся экспрессией	Количество генов с повышенной экспрессией	Количество генов с пониженной экспрессией
Люминальный А	165	104	61
Люминальный Б	164	84	80
HER2-позитивный	196	108	88
ТНРМЖ	186	89	97

Среди генов, экспрессия которых меняется при ТНРМЖ, изменение 34 генов является специфичным для этого подтипа рака: 17 с повышенной экспрессией (CLEC4A, CLEC5A, CLEC7A, IFNG, IL15, MUC16, COL9A3, COL22A1, PLOD3, NCAN, CRLF3, SDC2, NRTN, EGLN1, CTSV, HPSE, PRSS2), 17 с пониженной экспрессией (CXCL12, COL4A5, DCN, DPT, LAMB1, SPON1, OMD, NTN4, MUC20, SEMA5A, ANGPTL2, INHBB, PDGFC, VWA5A, HTRA1, PLAT, CST3). Изменение экспрессии этих генов не встречается в других подтипах РМЖ, что установлено в ходе отдельного сравнения генов, показавших повышенную и пониженную экспрессию.

Для генов со специфичной для ТНРМЖ повышенной экспрессией выявлена связь с двумя сигнальными путями: Protein digestion and absorption, Malaria. Можно интерпретировать эту связь как свидетельство активного ремоделирования ВКМ опухолевыми клетками.

Для генов со специфичной для ТНРМЖ пониженной экспрессией обнаружена связь с двумя другими путями: Axon guidance, Focal adhesion, что может свидетельствовать о высокой подвижности клеток ТНРМЖ.

Таким образом, показано, что агрессивный фенотип ТНРМЖ связан со специфичным изменением экспрессии 34 генов. Более детальное изучение этих генов и процессов, в которых они участвуют, может дать начало разработке новых терапевтических мишеней для лечения данного заболевания.

Литература

1. Smolarz B., Nowak A. Z., Romanowicz H. Breast Cancer — Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature) // Cancers. 2022. Vol. 14, No. 10. P. 2569.

2. Orrantia-Borunda E. Subtypes of Breast Cancer // Breast Cancer / ed. Mayrovitz H. N.; Department of Medical Education, Dr. Kiran C. Patel College of Allopathic Medicine, Nova Southeastern University, FL, USA. Exon Publications, 2022. P. 31–42.

3. Eble J. A., Niland S. The Extracellular Matrix in Tumor Progression and Metastasis // Clinical & Experimental Metastasis. 2019. Vol. 36, No. 3. P. 171–198.

4. Campbell N. E. Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis // Journal of Oncology. 2010. Vol. 2010. P. 1–13.

5. Henke E., Nandigama R., Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy // Frontiers in Molecular Biosciences. 2020. Vol. 6. P. 160.

6. Edgar R. Gene Expression Omnibus: NCBI Gene Expression and Hybridization Array Data Repository // Nucleic Acids Research. 2002. Vol. 30, suppl. 1 (Gene Expression Omnibus). P. 207–210.

7. Dubois T. Expression Profiling of Breast Cancer Samples from Institut Curie (Maire Cohort) — Affy CDF // NCBI Gene Expression Omnibus. 2015. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE65194 (date of access: 01.05.2025).

8. Affymetrix Inc. [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array // NCBI Gene Expression Omnibus. 2020. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL570 (date of access: 01.05.2025).

9. Naba A. et al. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices // Molecular & Cellular Proteomics. 2012. Vol. 11, No. 4 (The Matrisome). P. M111.014647.

10. Liberzon A. et al. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection // Cell Systems. 2015. Vol. 1, No. 6. P. 417–425.

11. Heberle H. et al. InteractiVenn: A Web-Based Tool for the Analysis of Sets Through Venn Diagrams // BMC Bioinformatics. 2015. Vol. 16, No. 1 (InteractiVenn). P. 169.

12. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2024. URL: https://www.kegg.jp (date of access: 05.05.2025).
13. Xie Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr // Current Protocols. 2021. Vol. 1, No. 3. P. e90.
14. Chen E. Y. et al. Enrichr: Interactive and Collaborative HTML5 Gene List Enrichment Analysis Tool // BMC Bioinformatics. 2013. Vol. 14, No. 1 (Enrichr). P. 128.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-18

РАЗРАБОТКА БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ПАЙПЛАЙНА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕОАНТИГЕНОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МРНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

DEVELOPMENT OF A BIOINFORMATIC PIPELINE FOR NEOANTIGEN IDENTIFICATION TO ENABLE PERSONALIZED MRNA VACCINE DESIGN AGAINST NON-SMALL CELL LUNG CANCER

К. М. Кириленко[1], А. А. Федоров[2], А. А. Ибрагимова[2], М. Р. Патышева[2], Д. Т. Султанова[2], Е. О. Родионов[2], Е. Б. Топольницкий[3,4], Д. М. Лоос[2], Ю. М. Суворова[5], Е. В. Денисов[2]

[1]Центр системной биоинформатики Томского НИМЦ РАН
[2]НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН
[3]Сибирский государственный медицинский университет, Томск
[4]Томская областная клиническая больница
[5]ООО «Биотехнологический кампус», Москва

K. M. Kirilenko[1], A. A. Fedorov[2], A. A. Ibragimova[2], M. R. Patysheva[2], D. T. Sultanova[2], E. O. Rodionov[2], E. B. Topolnitsky[3,4], D. M. Loos[2], Y. M. Suvorova[5], E. V. Denisov[2]

[1]Center for Systems Bioinformatics, Tomsk National Research Medical Centre RAS
[2]Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre RAS
[3]Siberian State Medical University, Tomsk
[4]Tomsk Regional Clinical Hospital
[5]Biotech campus LLC, Moscow

✉ kirillkirilenko.tomsk@gmail.com

Аннотация

В работе представлен биоинформатический пайплайн для идентификации иммуногенных неоантигенов у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Разработанный инструмент реализует полный цикл анализа — от поиска соматических мутаций до приоритизации эпитопов с учетом экспрессии, MHC-связывания, стабильности комплекса pMHC. Проведена валидация пайплайна на размеченных данных консорциума TESLA.

Abstract

A bioinformatic pipeline for the identification of immunogenic neoantigens was developed for non-small cell lung cancer patients. The tool implements a complete analysis workflow — from somatic mutation calling to the prioritization of epitopes, taking into account transcript expression, MHC binding affinity, and pMHC complex stability. The pipeline was validated using annotated datasets from the TESLA consortium.

Персонализированные противоопухолевые вакцины, включающие панель неоантигенов, являются новым перспективным направлением иммунотерапии злокачественных новообразований. Опухоль-специфичные неоантигены отсутствуют в нормальных тканях, что обеспечивает высокую специфичность и минимизирует риск поражения здоровых клеток. Клинические исследования продемонстрировали эффективность таких вакцин против ряда солидных опухолей [1, 2].

Ключевым этапом в разработке персонализированных противоопухолевых вакцин является надежная идентификация иммуногенных неоантигенов. Для этого используются данные ДНК-секвенирования опухоли и парной нормальной ткани для выявления соматических мутаций, а также РНК-секвенирования опухоли — для подтверждения экспрессии мутантных аллелей. Иммуногенность потенциальных неоантигенов обычно оценивается на основе предсказанной аффинности их связывания с молекулами MHCI/MHCII. Известно, что высокая аффинность не всегда коррелирует с реальной иммунной активностью пептида. Так, среди всех предсказанных неоантигенов с высокой аффинностью к MHCI не более 10 % оказываются иммуногенными [3]. Поэтому при отборе неоантигенов важно учитывать и дополнительные характеристики: уровень экспрессии соответствующего транскрипта, аллельную частоту экспрессированного мутантного варианта, стабильность комплекса «MHC — пептид» и др.

© К. М. Кириленко, А. А. Федоров, А. А. Ибрагимова, М. Р. Патышева, Д. Т. Султанова, Е. О. Родионов, Е. Б. Топольницкий, Д. М. Лоос, Ю. М. Суворова, Е. В. Денисов, 2025

Основным объектом исследования являются массивы данных, полученные в результате полногеномного и полнотранскриптомного секвенирования пациентов (n = 25), проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ и Томской областной клинической больницы, с диагнозом НМРЛ стадий T1–4N0–2M0–1 в возрасте от 55 до 83 лет. Для каждого из пациентов ранжировались неоантигены, найденные созданным алгоритмом, для отбора топ-30. Для оценки точности алгоритма идентификации иммуногенных неоантигенов использовались референсные датасеты консорциума TESLA (Tumor Neoantigen Selection Alliance), содержащие данные по полноэкзомному секвенированию опухолевой и парной нормальной ткани и РНК-секвенирования опухолевой ткани у пациентов с меланомой и немелкоклеточным раком легкого, а также список экспериментально проверенных иммуногенных неоантигенов. Для оценки качества ранжирования итогового списка неоантигенов считалась метрика AUPRC.

Разработан автоматизированный биоинформатический пайплайн для поиска и приоритизации неоантигенов, адаптированный под данные полногеномного секвенирования опухолей пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Входными данными пайплайна служат результаты ДНК-секвенирования опухоли и парной нормальной ткани, а также РНК-секвенирования опухоли. Пайплайн включает все основные этапы поиска неоантигенов и формирует ранжированный список приоритетных неоантигенов. В качестве метрики ранжирования неоантигенов использовался параметр NeoScore, включающий степень аффинности к MHCI, стабильность комплекса pMHCI, уровень экспрессии транскрипта [4]. Среди 34 валидированных неоантигенов из датасетов TESLA пайплайн нашел 30, средний AUPRC равен 0,31, 46 % неоантигенов из списка валидированных входят в топ-30 предсказанных пайплайном.

На основе результатов анализа для каждого пациента был сформирован индивидуальный список из 30 приоритетных неоантигенов с высоким иммуногенным потенциалом, отобранных для включения в состав персонализированной мРНК-вакцины. Найденные эпитопы будут использоваться для создания конструкции мРНК в условиях *in silico*, последующего синтеза тестового препарата и его тестирования в *ex vivo* исследованиях иммуногенности мРНК-вакцины на иммунных клетках пациентов.

Литература

1. Sahin Ugur et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer // Nature. 2017. Vol. 547 (7662). P. 222–226.

2. Rojas Luis A. et al. Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer // Nature. 2023. Vol. 618 (7963). P. 144–150.

3. Wells Daniel K. et al. Key parameters of tumor epitope immunogenicity revealed through a consortium approach improve neoantigen prediction // Cell. 2020. Vol. 183 (3). P. 818–834.

4. Borden Elizabeth S. et al. NeoScore integrates characteristics of the neoantigen: MHC class I interaction and expression to accurately prioritize immunogenic neoantigens // The Journal of Immunology. 2022. Vol. 208 (7). P. 1813–1827.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-19

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНЕ BMPR-IB НА КОНФОРМАЦИЮ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОДИРУЕМОГО БЕЛКА

EFFECT OF BMPR-IB GENE POLYMORPHISM ON THE CONFORMATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE ENCODED PROTEIN

Е. А. Климанова

Новосибирский государственный аграрный университет

E. A. Klimanova

Novosibirsk State Agrarian University

✉ kateri2403@mail.ru

Аннотация

Проведен комплексный анализ rs418841713 в гене BMPR-1B у овец, приводящего к аминокислотной замене Q305R. Выявлены изменения pI и массы белка при сохранении вторичной структуры. Анализ белок-белковых взаимодействий подтвердил, что BMPR-1B интегрирован в BMP-сигнальный путь и, хотя сам BMPR-1B не участвует напрямую в трансдукции сигнала через SMAD, его роль в регуляции фолликулогенеза, остеогенеза и хондрогенеза остается значимой.

Abstract

A comprehensive analysis of rs418841713 in the BMPR-1B gene in sheep was conducted, revealing a Q305R amino acid substitution. Changes in pI and protein mass were detected while secondary structure remained intact. Protein-protein interaction analysis confirmed BMPR-1B's integration into the BMP signaling pathway. Although not directly involved in SMAD signal transduction, BMPR-1B maintains significant regulatory roles in folliculogenesis, osteogenesis and chondrogenesis.

Рецептор костного морфогенетического белка 1B (BMPR-1B) у овец локализован на 6-й хромосоме. Содержит 16 экзонов, кодирует белок, состоящий из 558 аминокислотных остатков. По данным NCBI, наибольший уровень экспрессии наблюдается в фаллопиевых трубах и яичниках, что не противоречит данным об участии белка в фолликулогенезе не только у сельскохозяйственных животных, но и у человека [1]. Цель данной работы — выявление изменений в строении и функции BMPR-1B в результате однонуклеотидного полиморфизма и установление связей с другими белками.

Данные о полиморфизме и гене взяты из открытых баз данных NCBI, Ensembl и Uniprot. Информация об изменениях во вторичной структуре белка получена с помощью программы GOR4. Для вычисления физико-химических параметров белка применялась программа ProtParam. Анализ белок-белковых взаимодействий белкового продукта гена BMPR-1B выполнен с помощью базы данных string-db.org [2].

Всего по гену BMPR-1B есть информация о 2023 SNP, из них 23 представлены миссенс-вариантами, приводящими к аминокислотной замене. По базе данных Ensembl номер-идентификатор интересующего нас полиморфизма — rs418841713. Находится в области 8-го экзона гена рецептора костного морфогенетического белка 1B. Полиморфизм представляет собой замену аденина на гуанин в положении 746 нуклеотидной последовательности, что, в свою очередь, приводит к аминокислотной замене глутамина на аргинин в позиции 305 (Q305R) [3]. По данным Ensembl, частота минорного аллеля (MAF) составляет 0,250. Полиморфизм установлен для 38 популяций различных зарубежных пород овец. Только у 6 пород идентифицирован минорный аллель. Из них для 3 популяций минорный аллель является доминирующим — породы Bangladeshi, Garut, Sumatran. Также ранее получены данные о наличии rs418841713 у романовских овец, разводимых на территории Западной Сибири. Для романовских овец MAF составило 0,325.

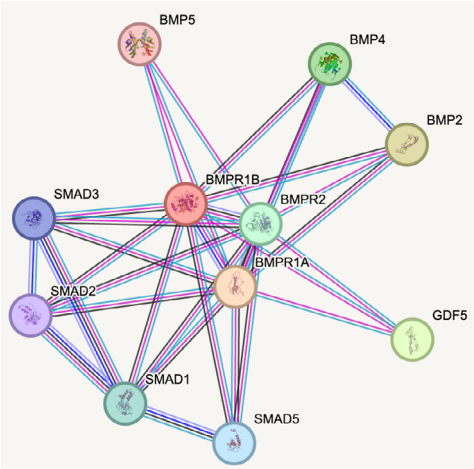
Программа GOR4 не выявила изменений во вторичной структуре белка в результате аминокислотной замены. Однако программа ProtParam помогла установить небольшие изменения, затрагивающие физико-химические свойства белка. Так, rs418841713 приводит к повышению теоретической изоэлектрической точки — для дикого типа она составляет 7,96, для мутантного — 8,12. Это результат замены нейтрально полярного глутамина на положительно заряженный аргинин, что, в свою очередь, увеличивает положительный заряд белка и сдвигает изоэлектрическую точку. Молекулярная масса изменилась незначительно с 63327,76 до 63355,81 Да, но это может оказать влияние на фолдинг белка.

© Е. А. Климанова, 2025

Структура белок-белковых взаимодействий показана на рисунке.

Был установлен порог достоверности в 0,9 для оценки взаимодействия между белками. По умолчанию программа ограничивает вывод 10 лучшими белок-белковыми взаимодействиями. Все рассмотренные белки входят в сигнальный путь BMP, BMPR-1B также участвует в процессах регуляции развития хряща и дифференциации остеобластов. Сам белок BMPR-1B не входит в процесс трансдукции сигнала белка SMAD (в этот процесс входят все представленные на рисунке белки, кроме BMPR-1B, BMPR-1A и BMPR-2), но имеются данные о его связи со всеми белками посредством коэкспрессии (черные линии), белковой гомологии (фиолетовые линии), что подтверждается результатами экспериментов и базами данных (голубые и розовые линии соответственно).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что полиморфизм rs418841713 может влиять на функциональную активность рецептора за счет изменения электростатических свойств белка, что требует дальнейших экспериментальных исследований для оценки его значимости.



Белок-белковые взаимодействия белкового продукта гена BMPR-1B, построенные с помощью string-db.org (Ovis aries)

Литература

1. Климанова Е. А., Александрова Д. А., Кочнев Н. Н. Молекулярно-генетический анализ взаимодействия генов, ассоциированных с репродуктивными функциями животных // Вестник НГАУ. 2025. № 1 (74). С. 170–176.

2. Климанова Е. А., Назаренко С. С., Назаренко А. В. База данных string как инструмент прогнозирования белок-белковых взаимодействий // Достижения и проблемы животноводства арктических и северных территорий Российской Федерации и сопредельных территорий. Новосибирск: ООО «Сибирская академическая книга», 2025. С. 108–110.

3. Климанова Е. А., Коновалова Т. В., Кочнев Н. Н. Полиморфизм локуса BMPR-IB у овец романовской породы в условиях Кузбасса // Зоотехния. 2024. № 1. С. 15–17.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-20

ПОИСК ОТЛИЧИТЕЛЬНЫХ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДНК*

SEARCH FOR DISTINCTIVE MARKERS OF ENDOTHELIAL DNA METHYLATION

В. А. Короленя[1,2], М. Л. Филипенко[1], М. А. Сметанина[1,2]

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

V. A. Korolenya[1,2], M. L. Filipenko[1], M. A. Smetanina[1,2]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Novosibirsk State University*

✉ korolenyavalerian@gmail.com

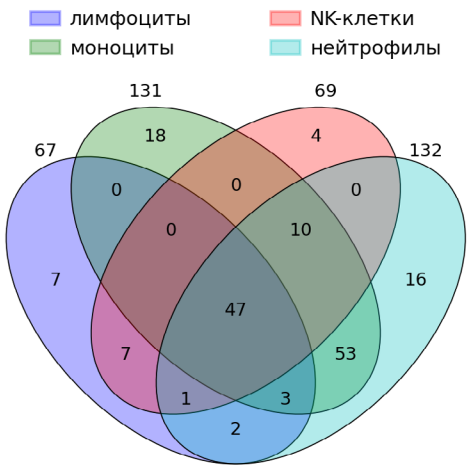
Аннотация

В рамках исследования эндотелиальной дисфункции существует необходимость установления принадлежности ДНК к определенному типу клеток. В исследовании был осуществлен поиск маркеров метилирования, по которым возможно отличить ДНК из эндотелиоцитов различной органной принадлежности от лейкоцитарной ДНК.

Abstract

In the context of endothelial dysfunction research, there is a necessity to establish the DNA affiliation to a specific cell type. The study aimed to search for methylation markers that could distinguish between DNA from endothelial cells of various locations and leukocyte DNA.

Эндотелиальная дисфункция является значимым фактором и признаком различных сердечно-сосудистых патологий, что определяет важность разработки подходов для исследования этого состояния [1, 2]. В качестве маркеров происхождения ДНК используют эпигенетические тканеспецифические особенности: метильные метки, размер (паттерн фрагментации) и топологию фрагментов ДНК. Исследователи продемонстрировали роль метилирования ДНК в дифференцировке эндотелиальных клеток [3–5], что предполагает возможность установления отличительных маркеров метилирования эндотелиальной ДНК.



Пересечение списков CG-локусов разных типов лейкоцитов, отличающих эндотелиальную ДНК

Задачей данного исследования является поиск локусов, статус метилирования которых позволит отличить эндотелиальную ДНК от ДНК лейкоцитов, тесно контактирующих с внутренней поверхностью сосудов. Для этого был осуществлен поиск открытых данных микрочиповых анализов в базах NCBI и EMBL-EBI. С помощью библиотек для Python numpy, scipy и matplotlib был проведен анализ, статистическая обработка и визуализация опубликованных данных. В работе был выполнен поиск маргинальных (Beta < 0,2 и Beta > 0,8) локусов ДНК в человеческих синусоидальных эндотелиальных клетках печени, клетках микрососудистого эндотелия легких, микрососудистых эндотелиальных клетках головного мозга, эндотелиальных клетках легочной артерии и эндотелиальных клетках пупочной вены [6], а также в лимфоцитах, натуральных киллерах, гранулоцитах и моноцитах [7].

Сравнение маргинальных локусов во всех исследуемых эндотелиальных клетках и лейкоцитах из 25 946 исследуемых локусов позволило выявить 15 931 схожий паттерн метилирования и 47 CG-локусов (см. рисунок), которые могут быть использованы для определения эндотелиальной ДНК в гетерогенном образце.

* Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-25-20187), Правительства Новосибирской области (соглашение № 30-2025-001030).

© В. А. Короленя, М. Л. Филипенко, М. А. Сметанина, 2025

Таким образом, исследование специфичных для эндотелиоцитов эпигенетических маркеров может внести вклад в исследование эндотелиальной дисфункции разной локализации.

Литература

1. Saenz-Medina J., Muñoz M., Rodriguez C. et al. Endothelial Dysfunction: An Intermediate Clinical Feature between Urolithiasis and Cardiovascular Diseases // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 2. P. 912.

2. Benincasa G., Coscioni E., Napoli C. Cardiovascular risk factors and molecular routes underlying endothelial dysfunction: Novel opportunities for primary prevention // Biochem. Pharmacol. 2022. Vol. 202. P. 115108.

3. Jeong Y., Jun Y., Kim J. et al. Integrative analysis of DNA methylation and mRNA expression during differentiation of umbilical cord blood derived mononuclear cells to endothelial cells // Gene. 2017. Vol. 635. P. 48–60.

4. Joo J.E., Hiden U., Lassance L. et al. Variable promoter methylation contributes to differential expression of key genes in human placenta-derived venous and arterial endothelial cells // BMC Genomics. 2013. Vol. 14. P. 475.

5. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N. et al. Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // Cell Cycle. 2010. Vol. 9, No. 5. P. 937–946.

6. Jamil M.A., Singer H., Al-Rifai R. et al. Molecular Analysis of Fetal and Adult Primary Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells: A Comparison to Other Endothelial Cells // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, No. 20. P. 7776.

7. Accomando W.P., Wiencke J.K., Houseman E.A. et al. Decreased NK cells in patients with head and neck cancer determined in archival DNA // Clin. Cancer Res. 2012. Vol. 18, No. 22. P. 6147–6154.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-21

ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ: ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ РУТИННЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

INNOVATIVE APPROACHES TO EARLY DIAGNOSIS OF CERVICAL CANCER: APPLICATION OF MACHINE LEARNING ALGORITHMS BASED ON ROUTINE HEMATOLOGICAL INDICATORS

А. И. Кузнецов

Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)

A. I. Kuznetsov

Moscow Aviation Institute (National Research University)

✉ drednout5786@yandex.ru

Аннотация

Статья посвящена разработке системы поддержки принятия врачебных решений для раннего выявления рака шейки матки (РШМ) на основе рутинных гематологических показателей. РШМ является серьезной проблемой здравоохранения, с высокой смертностью и сложностями в ранней диагностике. В исследовании, проведенном на 452 пациентках, была построена модель с использованием алгоритма XGB, показавшая ROC-AUC 98,2 % и высокую чувствительность и специфичность. Результаты подчеркивают значимость рутинных анализов в диагностике РШМ и потенциал интеграции модели в клиническую практику для улучшения исходов лечения.

Abstract

The article focuses on the development of a decision support system for the early detection of cervical cancer (CC) based on routine hematological indicators. CC poses a significant healthcare challenge, with high mortality rates and difficulties in early diagnosis. In a study involving 452 patients, a model was built using the XGB algorithm, achieving a ROC-AUC of 98.2 % along with high sensitivity and specificity. The results highlight the importance of routine tests in diagnosing CC and the potential for integrating the model into clinical practice to improve treatment outcomes.

Обоснование

Рак шейки матки (РШМ) занимает четвертое место по распространенности и третье по смертности. В 2022 г. в мире зарегистрирован 662 301 новый случай заболевания и 348 874 смерти от РШМ. В России за тот же год было 18 369 заболевших и 7903 умерших [1]. РШМ часто проявляется симптомами, которые могут быть связаны и с другими заболеваниями, что усложняет его раннее выявление. Традиционные диагностические методы, такие как биопсия, проводятся уже при видимом поражении, являются инвазивными и могут вызывать дискомфорт, кровотечение [2, 3]. Современные алгоритмы машинного обучения демонстрируют значительные успехи в предсказании исходов в различных областях онкологии [4–7]. Анализ показателей периферической крови давно считается важным инструментом для оценки состояния здоровья человека. Тем не менее мы не обнаружили исследований, посвященных созданию прогностических моделей для раннего выявления РШМ с применением алгоритмов машинного обучения, основанных на рутинных гематологических показателях, которые входят в стандартные и обязательные обследования при злокачественных заболеваниях.

Цель — разработка системы поддержки принятия врачебных решений (СППВР) для выявления пациенток с высоким риском наличия РШМ на основе рутинных показателей крови.

Методы

Одноцентровое когорное ретроспективное исследование проводилось на базе МНИОИ им. П. А. Герцена в 2000–2024 гг. В исследование включены 452 пациентки в возрасте 42,0 [33,75; 50,0] лет с подозрением на РШМ. Верификация исхода (выявление РШМ) была выполнена на основании гистологического исследования. Выборка была разделена на обучающую и тестовую в соотношении 70 : 30. Построение модели производилось с использованием Python 3.11.

© А. И. Кузнецов, 2025

Результаты

Модель, построенная с помощью алгоритма Extra Tree, показала ROC-AUC = 97,9 %, Random Forest = 97,8 %, Catboost = 97,3 %, Lasso = 97,2 %, Ridge = 97,0 %, SVM = 96,9 %, LightGBM = 94,3 %, k-Nearest Neighbors = 93,9 %, Naive Bayes = 90,2 %. Наилучшие показатели были достигнуты при использовании XGB. На тестовой выборке модель продемонстрировала ROC-AUC = 98,2 % [96,0; 99,7], чувствительность = 95,0 % [91,2; 98,3], специфичность = 91,7 % [81,0; 100,0]. Список наиболее значимых факторов риска включает агрегацию тромбоцитов с АДФ, СОЭ, Д-димер, трансферин, фибриоген, СРБ, всего 15 факторов из рутинных гематологических показателей, входящих в ОМС.

Заключение

Разработанная модель на основе алгоритма XGB может быть интегрирована в СППВР для ранней диагностики РШМ. Это позволит улучшить результаты лечения и снизить затраты на здравоохранение, оптимизируя профилактические стратегии для групп высокого риска.

Литература

1. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. URL: https://gco.iarc.fr/today/en (date of access: 29.04.2025).

2. Keskin N., Biyik I., Ince O. et al. Evaluation of the consistency ratios of cervical smear, cervical biopsy and conization results // Ginekologia Polska. 2021. Vol. 92, No. 11. P. 778–783.

3. Сушинская Т. В., Волченко Н. Н., Доброхотова Ю. Э. и др. Эффективность цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии и рака шейки матки в зависимости от способа взятия материала // Онкогинекология. 2017. Т. 3, № 23. С. 51–59.

4. Akazawa M., Hashimoto K. Artificial Intelligence in Ovarian Cancer Diagnosis // Anticancer Research. 2022. Vol. 40, No. 8. P. 4795–4800.

5. Li H., Lin J., Xiao Y. et al. Colorectal Cancer Detected by Machine Learning Models Using Conventional Laboratory Test Data // Technology in Cancer Research & Treatment. 2021. Vol. 20.

6. Bentick K., Runevic J., Akula S. et al. Machine learning models based on routinely sampled blood tests can predict the presence of malignancy amongst patients with suspected musculoskeletal malignancy // Methods. 2023. Vol. 220. P. 55–60.

7. Каприн А. Д., Сушинская Т. В., Кузнецов А. И. и др. Способ прогнозирования вероятности выявления рака шейки матки на основе рутинных показателей крови: патент на изобретение № 2802395; заявл. 16.05.2023; опубл. 28.08.2023. URL: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=54658031 (date of access: 29.04.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-22

ПОИСК И АНАЛИЗ СЕРПИНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРОВ В ТРАНСКРИПТОМАХ ЛЕНТОЧНЫХ ЧЕРВЕЙ *

SEARCH AND ANALYSIS OF SERPINS AS ACTIVE IMMUNOREGULATORS IN TAPEWORM TRANSCRIPTOMES

Л. И. Кутырева[1], Д. В. Диброва[2,3], И. А. Кутырев[4]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва*
[3]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[4]*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ*

L. I. Kutyreva[1], D. V. Dibrova[2,3], I. A. Kutyrev[4]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow*
[3]*Lomonosov Moscow State University*
[4]*Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude*

✉ kutyreva_00@inbox.ru

Аннотация

Иммунорегуляторы паразитов могут быть средством для лечения аутоиммунных и аллергических заболеваний. В этой работе в транскриптомах цестод лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* (плероцеркоид и половозрелая стадия), лентеца широкого *Dibothriocephalus latus*, ремнеца *Ligula interrupta* идентифицируются серпины — ингибиторы сериновых протеаз, которые являются потенциальными иммунорегуляторами.

Abstract

Parasite immunoregulators may be a means for treating autoimmune and allergic diseases. In this work, serpins, inhibitors of serine proteases, which are potential immunoregulators, are identified in the transcriptomes of cestodes of the seagull tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* (plerocercoid and adult stage), broad tapeworm *Dibothriocephalus latus*, and the *Ligula interrupta*.

В течение нескольких последних десятилетий промышленно развитые страны сталкиваются с ростом заболеваемости аллергическими и аутоиммунными заболеваниями. Гигиеническая гипотеза постулирует, что такой рост связан с уменьшением инвазии паразитами из-за улучшения санитарных условий [1]. Испытания на животных показали, что гельминтозная терапия, экскреторно-секреторные компоненты и синтетические молекулы, полученные из гельминтов, могут лечить и/или предотвращать воспалительные заболевания, такие как болезнь Крона, язвенный колит, сахарный диабет 1-го типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит и астма. Клинические испытания, направленные на лечение пациентов с аутоиммунными заболеваниями живыми гельминтами, показывают, что такой способ имеет терапевтический эффект [2].

Серпины — ингибиторы сериновых протеаз. Они модулируют иммунный ответ, ингибируя нейтрофильную эластазу, катепсин G, химазу и действуя как сигнальные молекулы, снижающие уровень провоспалительных медиаторов [3].

В данной работе представлена идентификация серпинов в транскриптомах ленточных червей: лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* (плероцеркоид и половозрелая стадия), лентеца широкого *Dibothriocephalus latus* (плероцеркоид), ремнеца *Ligula interrupta* (плероцеркоид) — и анализ доменных последовательностей найденных белков.

Из списка потенциальных иммунорегуляторов, составленного сотрудниками ИОЭБ СО РАН на основе анализа статей, были выбраны серпины, и их последовательности загружены из базы данных NCBI Protein. С помощью программы BLAST+ в транскриптомах исследуемых организмов были найдены транскрипты, похожие на серпины из ранее созданного файла. Отбирались последовательности, идентичные заданным более чем

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (рег. № 121030900141-8).

Авторы благодарят сотрудников ИОЭБ СО РАН: Ж. Н. Дугарова, О. Е. Мазур, О. Б. Жепхолову, Л. В. Толочко, Л. Д. Сондуеву за помощь в сборе материала.

© Л. И. Кутырева, Д. В. Диброва, И. А. Кутырев, 2025

на 70 % с e-value (критерий, показывающий случайность совпадения) < 0,001. Всего отобрано 47 транскриптов, которые выравниваются на 3 последовательности серпинов: JAP39688.1 (Ингибитор сериновой протеазы типа Кунитца, текстилинин-1, часть последовательности) [*Schistocephalus solidus*], JAP48521.1 (Ингибитор сериновой протеазы типа Кунитца 4, частичный) [*S. solidus*], JAP56883.1 (Ингибитор сериновой протеазы типа Кунитца, конотоксин Cal9.1a, частичный) [*S. solidus*].

С помощью инструментов InterPro и Boabio Domain Analyser 2.0 (https://boabio.belozersky.msu.ru/DomainAnalyser) были визуализированы домены. В итоге выяснено, что 46 транскриптов имеют серпиновый домен BPTI, а значит, обладают серпиновой активностью.

Все эти 46 транскриптов помимо доменов BPTI имеют повторяющиеся домены, похожие на EGF-like-домены, однако большинство из них имеет большой e-value (около 0,01). Некоторые из них похожи по доменной структуре с различием в один EGF-like-домен. Например, у плероцеркоида *D. dendriticus* есть транскрипты, которые отличаются отсутствием EGF-like-домена у одного из них, этого же EGF-like-домена нет и у похожего транскрипта половозрелой особи *D. dendriticus* (рис. 1). Возможно, такие EGF-like-домены вырезаются из белков в процессе посттрансляционной модификации.

Вдобавок, 11 найденных транскриптов имеют BPTI-домены только на N-конце, а после них идет 13 EGF-like-доменов (некоторые из них распознаются как EB module в Boabio Domain Analyser 2.0), домен иммуноглобулина и домен, который InterPro определяет как шестилопастный бета-пропеллер, TolB-like, а Boabio Domain Analyser 2.0 как домен с неизвестной функцией DUF4394 (см. рис. 1).



Рис. 1. Визуализация доменов транскрипта половозрелой особи (DDAS5_5) и транскриптов плероцеркоидов (DDAS5_3 и DDAS5_2) *D. dendriticus*: *синий* — Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain, *салатовый* — EB module, *красный* — Immunoglobulin domain, *темно-зеленый* — DUF4394; остальное — различные EGF-like домены: *розовый* — Complement Clr-like EGF-like, *голубой* — EGF domain, *темно-синий* — Tenascin EGF domain, *желтый* — EGF-like domain

Также один из транскриптов имеет Nidogen-like-домен, как и один из серпинов JAP39688.1 Ингибитор сериновой протеазы типа Кунитца текстилинин-1 (рис. 2), однако функция этого домена пока не известна.



Рис. 2. Визуализация доменов серпина JAP39688.1 Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-1, partial (Ингибитор сериновой протеазы типа Кунитца текстилинин-1, частичный) [*Schistocephalus solidus*] и транскрипта DDAS3_3 *D.dendriticus*: *синий* — Kunitz/Bovine pancreatic trypsin inhibitor domain, *оранжевый* — Nidogen-like, *розовый* — Complement Clr-like

Литература

1. Versini M., Jeandel P. Y., Bashi T. et al. Unraveling the Hygiene Hypothesis of helminthes and autoimmunity: origins, pathophysiology, and clinical applications // BMC Medicine. 2015. Vol. 13. P. 13–81.

2. Smallwood T. B., Giacomin P. R., Loukas A. et al. Helminth Immunomodulation in Autoimmune Disease // Frontiers in Immunology. 2017. Vol. 24. P. 8–453.

3. Wang D., Gou M., Hou J. et al. The role of serpin protein on the natural immune defense against pathogen infection in Lampetra japonica // Fish and Shellfish Immunology. 2019. Vol. 92. P. 196–208.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-23

ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В КАЧЕСТВЕ ТРИГГЕРА АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ *

TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS AS A TRIGGER FOR AUTOIMMUNE DISEASES

Ц. Ли[1,2], А. М. Тимофеева[2]

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

J. Li[1,2], A. M. Timofeeva[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ anna.m.timofeeva@gmail.com

Аннотация

Вирусные инфекции могут приводить к развитию аутоиммунного заболевания по механизму молекулярной мимикрии. В данной работе проведен анализ аутоиммунного потенциала Е-белка оболочки вируса клещевого энцефалита. Показано наличие участков идентичности между Е-белком и двумя белками человека, DNAH7 и CSMD2, которые могут узнаваться иммунной системой и быть ответственными за развитие аутореактивного ответа после инфицирования вирусом.

Abstract

Viral infections can lead to autoimmune diseases through molecular mimicry. This study analyzed the autoimmune potential of the envelope E-protein of the tick-borne encephalitis virus. Regions of identity were shown to exist between the E-protein and two human proteins, DNAH7 and CSMD2. These regions can be recognized by the immune system and may be responsible for the development of an autoimmune response after infection.

В литературе неоднократно сообщалось об ассоциации между различными вирусными инфекциями и аутоиммунными заболеваниями. Одним из механизмов, посредством которого инфекции могут приводить к развитию аутоиммунных процессов, является молекулярная мимикрия, при которой пептиды вирусных белков со структурным сходством с собственными пептидами могут вызывать активацию наивных аутореактивных Т- или В-клеток. Такая перекрестная реактивность может привести к развитию аутоиммунных заболеваний.

Теоретически иммунная система не должна вырабатывать антитела против собственных белков. Однако эволюционно вирусам выгодно иметь последовательности, похожие на человеческие, чтобы избежать иммунологического распознавания. Поэтому различные вирусные инфекции связаны с образованием аутореактивных антител, опосредованным мимикрией между человеческими и вирусными белками. Например, показана связь между инфекцией вирусом Эпштейна — Барр и повышением риска развития рассеянного склероза более чем в 30 раз [1, 2]. Связь вируса клещевого энцефалита с аутоиммунными заболеваниями ранее не изучалась, однако для других представителей семейства *Flaviviridae*, к которому также относится вирус клещевого энцефалита, описано развитие аутоиммунных заболеваний после перенесенной инфекции.

Развитие аутореактивных антител является нежелательным событием при инфицировании или вакцинации. Поэтому анализ аутоиммунного потенциала вирусных белков представляет значительный научный интерес. Анализ вирусных эпитопов важен при разработке мультиэпитопных вакцин, и эпитопы, обладающие гомологией с человеческими белками, не должны использоваться в разработке вакцины.

В данной работе проведен анализ возможности мимикрии между Е-белком вируса клещевого энцефалита и человеческими белками с использованием концепции коротких составных последовательностей (SCS) аминокислот в белках. Последовательность Е-белка была разделена на гептапептиды, смещенные друг относительно друга на один аминокислотный остаток. Полученный список гептапетидов был проанализирован на наличие гомологии с белками человека. В результате выявлено 11 белков, имеющих участки идентичности с Е-белком. Однако только SCS, расположенные внутри эпитопов, могут узнаваться иммунной системой. Поэтому далее было предсказано одновременное вхождение одиннадцати SCS в состав эпитопов как вирусного белка, так и белков человека. В результате выявлено 7 белков человека, которые имеют идентичные участки с Е-белком вируса клещевого энцефалита в структуре эпитопов, а значит, могут узнаваться иммунной системой.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-15-00010).

© Ц. Ли, А. М. Тимофеева, 2025

Для развития аутореактивного ответа необходима встреча клеток иммунной системы с аутоантигеном. Только белки, локализованные во внеклеточном пространстве, могут быть мишенью аутореактивных B-клеток. Два белка человека, DNAH7 и CSMD2, могут узнаваться иммунной системой и быть ответственными за развитие аутореактивного ответа после инфицирования вирусом клещевого энцефалита.

Литература

1. Bjornevik K., Cortese M., Healy B. C. et al. Longitudinal Analysis Reveals High Prevalence of Epstein-Barr Virus Associated with Multiple Sclerosis // Science. 2022. Vol. 375. P. 296–301.

2. Aloisi F., Giovannoni G., Salvetti M. Epstein-Barr Virus as a Cause of Multiple Sclerosis: Opportunities for Prevention and Therapy // Lancet Neurol. 2023. Vol. 22. P. 338–349.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-24

IN SILICO МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B В РАЗЛИЧНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ АНСАМБЛЯХ

IN SILICO MODELING OF THE SPATIAL STRUCTURE OF THE GLYCOSYLATED SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORTER NAPI2B IN DIFFERENT LIPID MEMBRANES AND THERMODYNAMIC ENSEMBLES

Е. В. Медведев, Р. А. Власенкова, Н. А. Акберова

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

E. V. Medvedev, R. A. Vlasenkova, N. A. Akberova

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ e.m.vladimirovich2001@stud.kpfu.ru

Аннотация

Эпитоп MX35 большого внеклеточного домена NaPi2b — потенциальная мишень в таргетной терапии рака яичника. Его пространственная структура не разрешена экспериментально, поэтому цель работы — смоделировать ее поведение методом равновесной молекулярной динамики, провести анализ главных компонент и сетей взаимодействий аминокислот. В 6 системах показано влияние липидного состава и термодинамического ансамбля на подвижность и стабильность структуры белка.

Abstract

The MX35 epitope of the NaPi2b large extracellular domain is a potential target in ovarian cancer targeted therapy. Its spatial structure hasn't been solved experimentally, therefore, the aim of the study is to model its behavior by the method of equilibrium molecular dynamics, to analyze principal components and networks of interactions of amino acids. The effect of the lipid composition and thermodynamic ensemble on the mobility and stability of the protein structure is shown in 6 systems.

Экспрессия натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b (SLC34A2) на внешней поверхности опухолевых клеток коррелирует с наличием целого ряда онкологических заболеваний (прежде всего рака яичника), — это позволяет рассматривать его в качестве кандидата на роль перспективной мишени для таргетной терапии [1]. **Эпитоп MX35** большого внеклеточного домена (ВКД) этого белка связывается с моноклональными антителами — компонентами конъюгатов антитело — лекарственное средство, что дает возможность нацеливать химиотерапевтический препарат на онкоклетки.

В настоящее время пространственная структура SLC34A2 не разрешена экспериментально, в связи с чем мы использовали его AlphaFold2.0 [2] модель AF-O95436-F1-v4.

Ранее было отмечено [3], что транспортер в клетке представлен в гликозилированной форме. Запись O95436 базы данных UniProt содержит сведения о том, что в большом ВКД белка имеются 5 сайтов N-гликозилирования аминокислотных остатков (а. о.) — аспарагина в 295, 308, 313, 321 и 340-й позиции. При помощи онлайн-сервисов AlphaFold Server и CHARMM-GUI [4] в каждую из них мы ввели гликозильный фрагмент — пентаманнозид (мономер — α-1,4-D-манноза).

Основываясь на результатах предварительных экспериментов и данных научной литературы, для моделирования систем мы выбрали 2 термодинамических ансамбля: канонический NVT и изобарно-изотермический NPT, а также построили 3 варианта липидных бислоев: PMm [5], POPC 100, POPC 50 + POPE 50.

С помощью инструмента Membrane builder онлайн-сервиса CHARMM-GUI модель NaPi2b с введенными ранее в его большой ВКД гликозильными остатками поместили в смоделированные мембраны, которые затем упаковали в ортогональные водные ячейки размером 140 Å × 140 Å × 190 Å с добавлением ионов Na^+ и Cl^- в концентрации 0,15 М.

Поведение большого ВКД смоделировали с помощью 10 нс равновесной молекулярной динамики (МД) полученных систем в программном пакете NAMD 3 (Nightly build) [6] с использованием силовых полей CHARMM36m и CHARMM36. Подготовку к ней провели в 3 этапа: сначала осуществили минимизацию энергии (0,1 нс), далее — нагрев (310 K), затем — эквилибрацию системы (0,1 нс).

© Е. В. Медведев, Р. А. Власенкова, Н. А. Акберова, 2025

Визуализацию и сравнительный анализ траекторий МД провели с использованием VMD 1.9.3 [7] и RStudio 2025.05.0 Build 496 (версия R 4.5.0 [8], пакет Bio3d 2.4-5 [9]) по следующим параметрам: среднеквадратическому отклонению (RMSD); среднеквадратической флуктуации (RMSF); площади поверхности, доступной для растворителя (SASA); радиусу гирации (Rg); энергиям электростатических взаимодействий (E_{el}) и сил Ван-дер-Ваальса (E_{VdW}). Характер конформационного поведения большого ВКД определили анализом главных компонент (PCA). При помощи веб-сервера RING 4.0 [10] создали сети межостаточных взаимодействий в белковых структурах, для количественного сравнения которых использовалась агломеративная иерархическая кластеризация и рассчитывалась кофенетическая корреляция. Для статистической обработки результатов использовали критерии Крускала — Уоллиса и Вилкоксона с поправкой Бонферрони.

В ходе проведенного исследования получили подтверждение рабочей гипотезы о том, что липидный состав мембраны влияет на RMSD, RMSF а. о. белка, большого ВКД и **эпитопа MX35**; E_{el} и E_{VdW} а. о. белка (подвижность и стабильность), а также были отвергнуты нулевые гипотезы о влиянии липидного состава мембраны на SASA, Rg а. о. большого ВКД и **эпитопа MX35** (компактность). Сравнительный анализ пар систем с различным термодинамическим ансамблем, совпадающих по липидному составу плазматической мембраны, показал значимое изменение RMSD, RMSF, E_{el} и E_{VdW}.

Полученные результаты PCA симуляций с ансамблем NPT свидетельствуют о том, что характер конформационного поведения большого ВКД (в т. ч. и **эпитопа MX35**) по трем главным компонентам определяется по исследуемым системам максимальной подвижностью а. о. Asn256, **Gly332** и минимальной подвижностью а. о. Phe254; флуктуации а. о. (полипептидного остова — C_α-атомов) по 1-й и 2-й главным компонентам во всех системах не различаются, а по 3-й главной компоненте — различаются в паре PMm-POPC 100.

Анализ сетей межостаточных взаимодействий показал, что только в системе POPC 50 + POPE 50 в **эпитопе MX35** большого ВКД были обнаружены а. о. с высокими значениями параметра центральности по концентрированию (топ 10 %): **Val314**, **Trp329** и **Trp336**, а также **Thr337**. Полученные в ходе анализа структурного сходства сетей взаимодействия а. о. значения кофенетической корреляции не превышают 0,45, что может указывать на существенные различия в топологической организации сетей взаимодействий в различных липидных окружениях.

Литература

1. Nurgalieva N. K., Popov V. E., Skripova V. S. et al. Sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b as a potential predictive marker for targeted therapy of ovarian cancer // Biochemistry and Biophysics Reports. 2021. Vol. 28. Art. 101104.

2. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. 2021. Vol. 596. P. 583–589.

3. Reshetnikova D., Bulatova L. F., Skripova V. et al. Effect of disulfide bonds and N-glycosylation on the recognition of the NaPi2b transporter by monoclonal antibodies // Annals of Oncology. 2022. Vol. 33. Art. S1408.

4. Jo S., Kim T., Iyer V. G. et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM // Journal of Computational Chemistry. 2008. Vol. 29. P. 1859–1865.

5. Pogozheva I. D., Armstrong G. A., Kong L. et al. Comparative molecular dynamics simulation studies of realistic eukaryotic, prokaryotic, and archaeal membranes // Journal of Chemical Information and Modeling. 2022. Vol. 62. P. 1036–1051.

6. Phillips J. C., Hardy D. J., Maia J. D. C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD // Journal of Chemical Physics. 2020. Vol. 153. Art. 044130.

7. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // Journal of Molecular Graphics. 1996. Vol. 14. P. 33–38.

8. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2025.

9. Grant B. J., Rodrigues A. P., ElSawy K. M. et al. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures // Bioinformatics. 2006. Vol. 22. P. 2695–2696.

10. Conte A. D., Camagni G. F., Clementel D. et al. RING 4.0: faster residue interaction networks with novel interaction types across over 35,000 different chemical structures // Nucleic Acids Research. 2024. Vol. 52. P. W306–W312.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-25

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕГИДРИНОВ У РОДА *QUERCURS* *

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DEHYDRIN IN THE GENUS *QUERCURS*

А. А. Олейников, П. А. Зыбинская, П. А. Крылов

Федеральный научный центр агроэкологии РАН, Волгоград

A. A. Oleynikov, P. A. Zybinskaya, P. A. Krylov

Federal Scientific Center of Agroecology RAS, Volgograd

✉ krylov-p@vfanc.ru

Аннотация

Дегидрины обеспечивают защиту растений от влияния различных неблагоприятных факторов окружающей среды, в частности засухи. Ввиду того что геномы рода *Quercus* секвенированы относительно недавно, аннотация генов дегидринов выполнена не была. С использованием инструментов биоинформатики было выявлено 30 дегидринов у четырех основных видов рода *Quercus* и дана их структурно-функциональная и филогенетическая аннотация.

Abstract

Dehydrins provide plant protection against the effects of various adverse environmental factors, particularly drought. Since the genomes of the *Quercus* genus have been sequenced relatively recently, the annotation of the dehydrin genes has not been performed. Using bioinformatics tools, 30 dehydrins were identified in four main species of the *Quercus* genus and their structural, functional and phylogenetic annotation was provided.

Неблагоприятные условия окружающей среды, такие как засуха, оказывают значительное влияние на рост и развитие растений [1]. Среди множества молекулярно-генетических механизмов защиты клеток растений от повреждений важную роль играют дегидрины [2]. Основной особенностью дегидринов является их динамичная структура, которая позволяет им выполнять защитные функции [3, 4]. В связи с вышесказанным целью работы стала структурно-функциональная и филогенетическая аннотация дегидринов у представителей рода *Quercus*, которые используются в защитном лесоразведении и агролесомелиорации.

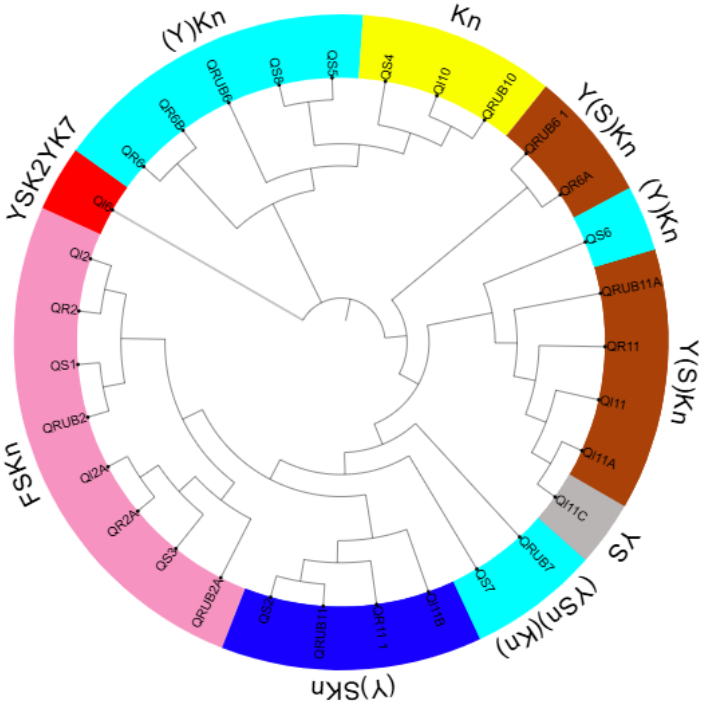
Аминокислотные последовательности дегидринов *Q. robur*, *Q. lobata*, *Q. suber*, *Q. rubra* были получены из информационных баз данных NCBI. Для идентификации всех потенциальных дегидринов была использована HMMER v3.3.2 с задействованием скрытой марковской модели (HMM) UCH (PF00257) из Pfam против последовательностей всего генома. ModelTest-NG v0.1.7 и RAxML-NG v1.2.0 были использованы для поиска наилучшей модели филогенетического дерева максимального правдоподобия со значением бутстрепа 1000. Физико-химические характеристики идентифицированных дегидринов были проанализированы с помощью веб-инструмента ProtParam. Субклеточная локализация дегидринов была предсказана с помощью WoLF PSORT. Консервативные мотивы в последовательностях дегидринов были идентифицированы с использованием MEME v5.5.3 со следующими параметрами: максимальное количество мотивов — 20, с нулевым или одним появлением на последовательность.

С помощью поиска HMM и необходимых критериев фильтрации мы идентифицировали 30 потенциальных дегидринов: у *Q. robur* — 7, *Q. lobata* — 8, Q. *suber* — 8, *Q. rubra* — 7. Учитывая, что для отнесения белка к дегидринам он должен иметь консервативные сегменты, мы провели множественные выравнивания 30 этих последовательностей с использованием MAFFT v7.520. Результаты показали, что 6 идентифицированных белков имеют структуру YSK_2, 6 белков имеют структуру FSK_3, 2 белка были определены как FSK_2-дегидрины, по 3 белка относятся к типам YSK_3 и K_3 и по 1 белку относятся к типам дегидринов YSK_2YK_7, SK_3, YS, YK_5, YK_4, YK_9, YK_2, YK_3, YK, K_1 и K_2. Анализ физико-химических свойств показал, что молекулярные массы дегидринов у рода *Quercus* варьируются от 10,4 до 87,7 кДа, а значения pI варьируются от 4,81 до 9,79, что подразумевает разнообразие функций в пределах семейства. Было определено, что все дегидрины в большей степени локализируются в ядре, цитоплазме и мембране. Данные, полученные на основе прогнозирования субклеточного расположения дегидринов, показали, что большая их часть локализована в ядре. Это требует дальнейшего изучения, так как функция, выполняемая ими в клеточном ядре, в полной степени не ясна.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № FNFE-2025-0013.

© А. А. Олейников, П. А. Зыбинская, П. А. Крылов, 2025

Филогенетический анализ дегидринов у 4 видов рода *Quercus* позволил идентифицировать 3 ветви (см. рисунок): первая содержит 1 группу, вторая имеет в своем составе 2 группы без наличия S-сегмента, третья ветвь содержит 7 групп с различными сегментами.



Филогенетические связи дегидринов у *Q. robur* (QR), *Q. lobata* (Ql), *Q. suber* (QS) *и Q. rubra* (QRUB)

В частности, единственным представителем первой ветви является белок YSK2YK7 *Q. lobata*. Группы $(Y)K_n$, K_n содержат от одного до трех дегидринов у видов рода *Quercus*. Группы $Y(S)K_n$, $(Y)K_n$, YS, $(YS_n)(K_n)$, $(Y)SK_n$, FSK_n охватывают от 5 до 6 белов соответственно. Дегидрины четырех видов были хаотично распределены по группам, что может говорить о сохранении определенных эволюционных паттернов. Это также может указывать на то, что основные функции дегидринов сохраняются у разных видов, несмотря на филогенетические различия. Кроме того, такое распределение может отражать функциональную диверсификацию дегидринов внутри каждого вида, иными словами, на различные роли в ответе на стресс.

Полученные результаты способствуют расширению знаний о роли дегидринов в механизмах устойчивости к стрессу у рода *Quercus* и их дальнейшему изучению.

Литература

1. Ding Y., Shi Y., Yang, S. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures // Molecular plant. 2020. Vol. 13 (4). P. 544–564.

2. Karas M., Vešelényiová D., Boszorádová E. et al. Comparative analysis of dehydrins from woody plant species // Biomolecules. 2024. Vol. 14 (3). P. 250.

3. Азаркович М. И. Дегидрины в ортодоксальных и рекальцитрантных семенах. // Физиология растений. 2020. Т. 67, № 2. С. 130–140.

4. Szlachtowska Z., Rurek M. Plant dehydrins and dehydrin-like proteins: characterization and participation in abiotic stress response // Frontiers in Plant Science. 2023. Vol. 14. P. 1213188.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-26

КЛАССИЧЕСКИЕ АЛГОРИТМЫ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И НЕЙРОСЕТИ В ЗАДАЧЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЗЯЕВ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ НАСЕКОМЫХ, МЛЕКОПИТАЮЩИХ И РАСТЕНИЙ

TRADITIONAL MACHINE LEARNING APPROACHES AND NEURAL NETWORKS IN THE TASK OF HOST IDENTIFICATION FOR RNA VIRUSES INFECTING *INSECTA*, *MAMMALIA*, AND *VIRIDIPLANTAE*

Ф. С. Перелыгин[1,2], А. Н. Лукашев[1,3], Ю. А. Алешина[1,2]

[1] *Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Сеченовского университета, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3] *НИИ системной биологии и медицины, Москва*

F. S. Perelygin[1,2], A. N. Lukashev[1,3], Y. A. Aleshina[1,2]

[1] *Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*
[3] *Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow*

✉ perelygin_f_s@staff.sechenov.ru

Аннотация

В данной работе исследуется проблема определения хозяев вирусов по особенностям состава геномов. Оценивается влияние таксономического состава обучающей выборки, набора признаков, алгоритма и длины нуклеотидной последовательности на качество классификации.

Abstract

The virus-host prediction based on virus genome composition is investigated. The effect of the taxonomic composition of the training sample, the set of features, the algorithm, and the length of the nucleotide sequence on classification quality is evaluated.

Изучение метавирома у различных видов-хозяев привело к открытию множества новых вирусов. Однако поскольку метавиром (особенно фекальный) состоит из генетического материала вирусов разного происхождения (собственные вирусы организма, вирусы из его пищи и т. д.), необходимы методы для точного определения хозяев вирусов по их геномным последовательностям.

Классические алгоритмы машинного обучения (Machine Learning, ML) были применены в задаче предсказания хозяев РНК-содержащих вирусов, инфицирующих три группы организмов: млекопитающих, насекомых и растения. В качестве признаков использовались частоты встречаемости нуклеотидных *k*-меров (последовательностей длиной от 1 до 7).

Как референсные методы на основе выравнивания (tBLASTx) с геномами близкородственных вирусов, так и ML-алгоритмы, обученные на геномах близкородственных вирусов, продемонстрировали высокую точность классификации (минимальная взвешенная F1-мера = 0,88). Однако при идентификации хозяев для вирусов новых родов (не представленных в обучающей выборке) эффективность ML-методов снизилась (наилучшая взвешенная F1-мера = 0,79), но все же оставалась выше, чем у методов, основанных на гомологии (F1-мера = 0,68).

В ходе исследования было показано влияние длины вирусных нуклеотидных последовательностей, используемых для обучения, на качество классификации. В задаче определения хозяев вирусов по коротким фрагментам длиной 400 и 800 нуклеотидов (нт) сравнивались классификаторы, обученные на полных геномах и на коротких фрагментах соответствующей длины. Сравнительный анализ показал, что модели, обученные и протестированные на фрагментах одной длины, демонстрировали более высокое качество классификации по сравнению с полногеномными моделями: прирост медианной взвешенной F1-меры составил 0,04, при этом была улучшена воспроизводимость результатов в 10 повторностях. Разработанный метод позволил достичь F1-меры 0,63 и 0,67 для фрагментов 400 и 800 нуклеотидов соответственно, что на 0,20 превышает показатели традиционного метода tBLASTx.

© Ф. С. Перелыгин, А. Н. Лукашев, Ю. А. Алешина, 2025

Применение нейросети из трех сверточных слоев или глубокой сверточной нейросети LegNet [1] не позволило значительно повысить качество классификации в сравнении с референсным классификатором на основе классического ML. ДНК языковая модель на основе блока BERT инструмента BERTax [2] показала лучшее качество классификации (взвешенная F1-мера = 0,77) в сравнении с референсным методом (реализация градиентного бустинга XGBoost, обученная на частотах встречаемости *k*-меров при *k* = 4; взвешенная F1-мера = 0,71). Нейронная сеть, включающая блок BERT модели ViraLM [3], провалилась в задаче предсказания хозяев неизвестных вирусов. При оценке кластеризации фрагментов геномов вирусов и мРНК их хозяев на скрытых слоях блока BERT нейросети ViraLM было показано, что нейросеть хорошо разделяет фрагменты хозяев вирусов от вирусных фрагментов, но практически не выделяет фрагменты вирусов в отдельные группы по хозяевам.

Для того чтобы выяснить, насколько в разных группах хозяев выражены особенности генома, имитируемые РНК-вирусами (например, чтобы избежать распознавания иммунной системой), классификаторы, обученные на вирусных геномах, были протестированы на фрагментах мРНК хозяев вирусов. Модель XGBoost показала хорошее качество классификации при выявлении фрагментов мРНК насекомых (точность = 0,74, F1-мера = 0,65) и млекопитающих (точность = 0,73, F1-мера = 0,65), однако провалилась при определении фрагментов мРНК растений (точность = 0,31, F1-мера = 0,42). Таким образом, можно предположить, что геномы насекомых и млекопитающих содержат более выраженные признаки, к которым приспосабливаются вирусы, в сравнении с растениями.

Литература

1. Penzar D. et al. LegNet: a best-in-class deep learning model for short DNA regulatory regions // Bioinformatics. 2023. Vol. 39, No. 8.

2. Mock F. et al. Taxonomic classification of DNA sequences beyond sequence similarity using deep neural networks // Proc. Natl. Acad. Sci. 2022. Vol. 119, No. 35.

3. Peng C. et al. ViraLM: empowering virus discovery through the genome foundation model // Bioinformatics. 2024. Vol. 40, No. 12.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-27

IN SILICO АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ХЕЛИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ

IN SILICO ANALYSIS OF POTENTIAL MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CHELIDONIC ACID

А. Ю. Рыжкова, А. В. Лешенкова, Т. Ф. Насибов, А. В. Горохова

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

A. Yu. Ryzhkova, A. V. Leshenkova, T. F. Nasibov, A. V. Gorokhova

Siberian State Medical University, Tomsk

✉ alya.ryzhkova.2003@mail.ru

Аннотация

Хелидоновая кислота (ХК) представляет интерес как биологически активное соединение с выраженными противовоспалительными, остеогенными, противоопухолевыми и антиметаболическими свойствами. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе ее фармакологических эффектов, остаются недостаточно изученными, что ограничивает ее дальнейшее применение в клинической практике.

Abstract

Chelidonic acid (CA) is of interest as a biologically active compound with pronounced anti-inflammatory, osteogenic, antitumor, and antimetabolic properties. However, the molecular mechanisms underlying its pharmacological effects remain insufficiently understood, which limits its further application in clinical practice.

Целью настоящей работы являлось прогнозирование потенциальных мишеней действия хелидоновой кислоты на уровне генов и метаболических путей с использованием методов компьютерного моделирования.

Материалы и методы

Для *in silico* анализа использовался веб-сервис DIGEP-Pred 2.0, основанный на технологии PASS и обученный на базе данных сравнительной токсикогеномики (CTD) и экспериментальных микрочипов из карты связности (cMAP). Этот инструмент позволяет оценить вероятность активации или ингибирования экспрессии генов на основе структурной формулы исследуемого соединения. Средняя точность предсказаний составляет 86,5 %. Для биологической интерпретации результатов был проведен анализ избыточной репрезентативности (ORA) с привлечением баз данных KEGG, WikiPathways и Gene Ontology. Обработка данных выполнялась в среде RStudio с использованием языка программирования R.

Результаты

Анализ позволил выделить 11 672 гена с высокой вероятностью модуляции экспрессии при воздействии хелидоновой кислоты. Из них 5371 ген предположительно активируется, а 6301 — ингибируется. Функциональная аннотация показала, что предсказанные гены вовлечены в регуляцию процессов клеточной пролиферации, миграции и инвазии, что может соответствовать ранее описанным противоопухолевым эффектам ХК. Также была обнаружена потенциальная связь с повышением чувствительности β-клеток поджелудочной железы к глюкозе и снижением инсулинорезистентности. Отдельный интерес представляет участие выявленных генов в путях, ассоциированных с противовоспалительным ответом, включая регуляцию факторов TNF, IL17 и HIF1α. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о возможной стимуляции остеогенных процессов за счет активации кальциевого транспорта, остеобластической активности и минерализации межклеточного матрикса.

Заключение

Результаты *in silico* моделирования указывают на широкий спектр молекулярных эффектов хелидоновой кислоты, включая регуляцию экспрессии генов, вовлеченных в опухолевую трансформацию, воспаление, метаболизм и остеогенез. Полученные данные служат основой для последующих *in vitro* и *in vivo* исследований, направленных на экспериментальную верификацию выявленных генов-мишеней и сигнальных каскадов.

© А. Ю. Рыжкова, А. В. Лешенкова, Т. Ф. Насибов, А. В. Горохова, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-28

ОБЛИГАТНЫЕ АЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ ДЕМОНСТРИРУЮТ БОЛЕЕ ВЫСОКУЮ ЧАСТОТУ МУТАЦИЙ A>G ПО СРАВНЕНИЮ С АНАЭРОБАМИ *

OBLIGATE AEROBIC BACTERIA SHOW HIGHER A>G MUTATION RATE COMPARING TO ANAEROBES

А. В. Скуднов[1], Э. А. Бадамшин[1], Б. Э. Ефименко[1], К. В. Гунбин[1], К. Ю. Попадьин[1], С. В. Денисов[2]

[1] *Центр геномных исследований Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград*
[2] *Манчестерский университет, Великобритания*

A. V. Skudnov[1], E. A. Badamshin[1], B. E. Efimenko[1], K. V. Gunbin[1], K. Y. Popadin[1], S. V. Denisov[2]

[1] *Center for Mitochondrial Functional Genomics, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*
[2] *The University of Manchester, United Kingdom*

✉ alexey.skudnov@yadndex.ru

Аннотация

Нейтральные мутационные спектры на данный момент являются ценной качественной и количественной характеристикой мутагенеза организмов. Однако получение бактериальных мутационных спектров осложнено наличием паралогичных генов и горизонтального переноса, что мешает правильной реконструкции направленности мутагенеза. Использование разработанного нами пайплайна BacNeMu позволило проанализировать все доступные бактериальные виды с имеющимися кислородными статусами на дереве AnnoTree [1], и мы обнаружили преобладающие T:A>C:G-мутации в усредненных нейтральных мутационных спектрах облигатно аэробных бактерий, что соотносится с более ранними исследованиями на митохондриальной ДНК [2] и влияния кислорода на повышенные частоты A>G-перехода.

Abstract

Neutral mutational spectra remain one of the most valuable quantitative characterization of mutagenesis in organisms. However, the acquisition of bacterial mutational spectra is complicated by the presence of paralogous genes and horizontal transfer, which hinders the correct reconstruction of the directionality of mutagenesis. Using the BacNeMu pipeline we developed, we analyzed all available bacterial species with available oxygen statuses on the AnnoTree phylogenetic tree [1], and found predominant T:A>C:G mutations in obligate aerobes averaged mutational spectra, which correlates with earlier studies on mitochondrial DNA [2] and impact of oxygen on A>G mutation.

Понимание **мутационного спектра** (MutSpec) дает представление о факторах, вызывающих мутации. В то время как процессы, лежащие в основе специфических мутационных подписей, были широко изучены в раковых и нормальных тканях [1], бактериальным видам уделялось сравнительно мало внимания [3].

Мы представляем **BacNeMu** — биоинформатический конвейер, предназначенный для реконструкции нейтральных бактериальных мутационных спектров. BacNeMu адаптирован из недавно опубликованного пайплайна NeMu [4]. BacNeMu уникален своей способностью анализировать все доступные бактериальные данные с точностью и легкостью благодаря глубокой интеграции с ведущими прокариотическими базами данных AnnoTree [1] и GTDB [5].

Спектры мутаций, полученные с помощью BacNeMu, демонстрируют хорошее соответствие со спектрами, измеренными непосредственно в экспериментах по накоплению мутаций у нескольких видов бактерий из разных частей филогенетического древа. Это подтверждает, что мы можем строить нейтральные мутационные спектры нашим подходом и позволяет проводить крупномасштабные исследования факторов, формирующих **нейтральный** бактериальный MutSpec.

В качестве первого анализа мы проверили гипотезу о том, что аэробные и анаэробные виды бактерий демонстрируют различные мутационные спектры. Наш предварительный анализ, сделанный на основе 6-компонентных мутационных спектров, подтвердил, что мутация A>G (и ее комплементарная мутация T>C), которая ранее была связана с реакциями окислительного повреждения в митохондриях [2], значительно чаще встречается у облигатных аэробов по сравнению с облигатными анаэробами. Наблюдаемые переходы также соотносятся с ранее описанными различиями в GC-составе между облигатными аэробами и облигатными

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-20143).

© А. В. Скуднов, Э. А. Бадамшин, Б. Э. Ефименко, К. В. Гунбин, К. Ю. Попадьин, С. В. Денисов, 2025

анаэробами [6]. Кроме того, мы проанализировали четыре клады близкородственных аэробных и анаэробных бактерий и обнаружили, что мутационный спектр в целом сохраняется из-за филогенетической инерции, что согласуется с данными работы [7]. Также нами показано, что на больших филогенетических расстояниях он в первую очередь определяется аэробным статусом бактериальной клады [7].

В дальнейшем мы собираемся использовать пайплайн BacNeMu для всех секвенированных/аннотированных видов бактерий, чтобы выявить влияние экологических факторов (например, температуры) и внутриклеточных механизмов (например, репарации ДНК, свойств репликации) на эволюцию мутационных спектров.

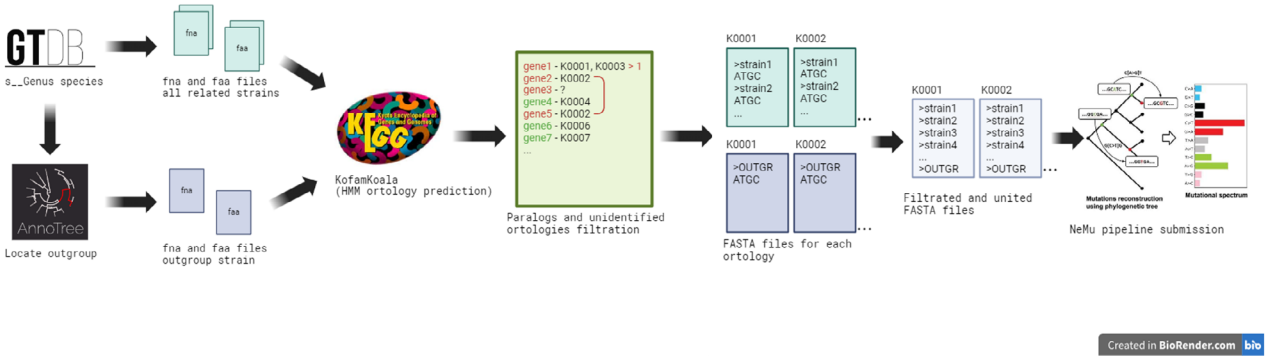


Схема работы пайплайна BacNeMu

Литература

1. Mendler K. et al. AnnoTree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life // Nucleic Acids Research. 2019. Vol. 47, No. 9. P. 4442–4448.

2. Mikhailova A. G. et al. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // Nucleic Acids Research. 2022. Vol. 50, No. 18. P. 10264–10277.

3. Ruis C. et al. Mutational spectra are associated with bacterial niche // Nature Communications. 2023. Vol. 14, No. 1. P. 7091.

4. Efimenko B. et al. NeMu: a comprehensive pipeline for accurate reconstruction of neutral mutation spectra from evolutionary data // Nucleic Acids Research. 2024. Vol. 52, No. W1. P. W108–W115.

5. Parks D. H. et al. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // Nucleic Acids Research. 2022. Vol. 50, No. D1. P. D785–D794.

6. Aslam S. et al. Aerobic prokaryotes do not have higher GC contents than anaerobic prokaryotes, but obligate aerobic prokaryotes have // BMC Evolutionary Biology. 2019. Vol. 19, No. 1. P. 35.

7. Davin A. A. et al. A geological timescale for bacterial evolution and oxygen adaptation // Science. 2025. Vol. 388, No. 6742.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-29

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕННОЙ СЕТИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ANDSYSTEM

RECONSTRUCTION OF THE GENE NETWORK OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER USING THE ANDSYSTEM

Д.-М. В. Цейликман[1], Е. В. Бурлаков[1], А. А. Ермоленко[1], А.-Л. А. Макарова[2], В. А. Иванисенко[2]

[1] *Челябинский государственный университет*
[2] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

D.-M. V. Tseilikman[1], E. V. Burlakov[1], A. A. Ermolenko[1], A.-L. A. Makarova[2], V. A. Ivanisenko[2]

[1] *Chelyabinsk State University*
[2] *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

✉ ararat.sinaev@yandex.ru

Аннотация

В работе проведена реконструкция генной сети ПТСР с помощью ANDSystem. Выявлены ключевой хаб вокруг BDNF и кластер генов некроптоза (RIPK1, RIPK3, MLKL), связанных с провоспалительными медиаторами. Это указывает на возможное взаимодействие нейротрофических и воспалительных путей в патогенезе ПТСР.

Abstract

The gene network of PTSD was reconstructed using ANDSystem. A key hub around BDNF and a cluster of necroptosis-associated genes (RIPK1, RIPK3, MLKL) linked by proinflammatory mediators were identified, suggesting interplay between neurotrophic and inflammatory pathways in PTSD pathogenesis.

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) представляет собой сложное психическое расстройство, развивающееся после воздействия тяжелых психотравмирующих событий. Современные исследования показывают, что в патогенезе ПТСР значительную роль играют молекулярно-генетические механизмы, включая нарушения экспрессии генов нейротрофических факторов и активацию процессов программируемой клеточной гибели [1].

В последние годы активно развиваются подходы системной биологии для исследования молекулярных основ психических расстройств. Одним из перспективных направлений является реконструкция и анализ генных сетей, позволяющих выявить ключевые молекулярные хабы и взаимодействия между генами, ассоциированными с заболеванием. Система ANDSystem, разработанная в ИЦиГ СО РАН, представляет собой мощный инструмент для автоматической реконструкции ассоциативных генных сетей на основе анализа научной литературы методами text-mining [2].

Некроптоз — недавно описанная форма программируемой клеточной гибели, которая играет важную роль в нейровоспалении и может быть вовлечена в патогенез ПТСР. Ключевыми медиаторами некроптоза являются киназы RIPK1 и RIPK3, а также псевдокиназа MLKL. В отличие от апоптоза, некроптоз сопровождается высвобождением провоспалительных молекул и активацией иммунного ответа, что может способствовать развитию нейровоспаления при ПТСР.

Учитывая роль BDNF в нейропластичности и стрессовых реакциях, а также потенциальное участие некроптоза в нейровоспалительных процессах при ПТСР, представляется важным изучение взаимодействий между этими молекулярными системами в контексте патогенеза данного расстройства.

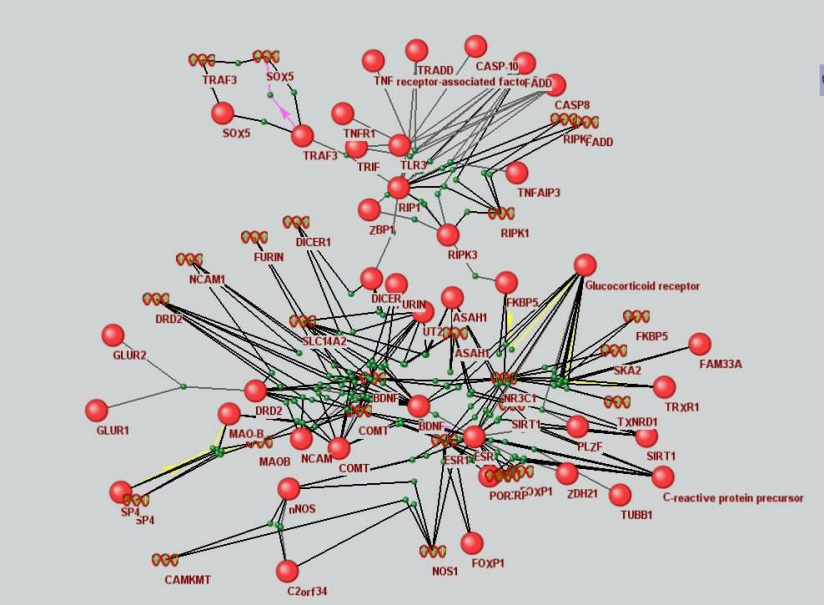
Мы реконструировали генную сеть ПТСР с использованием системы ANDSystem и проанализировали роль BDNF и генов, ассоциированных с некроптозом, в молекулярных механизмах заболевания.

Реконструированная генная сеть ПТСР включает 156 генов и 312 взаимодействий между ними. Анализ топологии сети выявил основной хаб вокруг гена BDNF, который демонстрировал наибольшее количество связей с другими генами сети (степень узла = 28). BDNF взаимодействовал с генами нейротрансмиттерных систем (HTR2A, DRD2, SLC6A4), гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (NR3C1, FKBP5, CRHR1) и воспалительного ответа (TNF, IL1B, IL6).

© Д.-М. В. Цейликман, Е. В. Бурлаков, А. А. Ермоленко, А.-Л. А. Макарова, В. А. Иванисенко, 2025

Второй значимый кластер был сформирован генами, ассоциированными с некроптозом: RIPK1, RIPK3, MLKL, TNF, FADD. Эти гены демонстрировали высокую степень взаимной связанности и формировали отдельный функциональный модуль в общей структуре сети. Важно отметить, что некроптозный кластер был связан с BDNF-хабом через RIPK1\RIPK3, указывая на потенциальные молекулярные пути взаимодействия между нейротрофическими и некроптозными механизмами.

Реконструированная с помощью системы ANDSystem генная сеть ПТСР демонстрирует сложную архитектуру с двумя основными функциональными модулями: BDNF-центрированным хабом, регулирующим нейропластичность и стрессовый ответ, и кластером генов некроптоза, вовлеченных в нейровоспаление. Выявленные взаимодействия между этими модулями через провоспалительные медиаторы указывают на потенциальную роль некроптоза в патогенезе ПТСР и открывают новые перспективы для разработки таргетной терапии данного расстройства.



Реконструированная генная сеть (с помощью ANDSystem)

Литература

1. Сукиасян С. Г., Солдаткин В. А., Снедков Е. В. и др. Боевое посттравматическое стрессовое расстройство: от «синдрома раздраженного сердца» до «психогенно-органического расстройства». Биологический аспект // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2020. Т. 120, № 7. С. 149–156.

2. Demenkov P. S., Ivanisenko T. V., Kolchanov N. A., Ivanisenko V. A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem // In Silico Biol. 2011–2012. Vol. 11, No. 3–4. P. 149–161.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-30

СЕТЕВОЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯЦИИ ФЕРРОПТОЗА И ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ В ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ

NETWORK ANALYSIS OF FERROPTOSIS AND GLUTATHIONE SYSTEM REGULATION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

А. Е. Чернышева[1], В. В. Мелехин[1,2]

[1] *Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург*
[2] *Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург*

A. E. Chernysheva[1], V. V. Melekhin[1,2]

[1] *Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg*
[2] *Ural State Medical University, Yekaterinburg*

✉ chernysheva_ae@niivirom.ru

Аннотация

Транскриптомный анализ TCGA-LIHC выявил 4 ключевых гена (GCLC, GCLM, GSS, GPX4), связывающих глутатионовый метаболизм и ферроптоз. Сетевой анализ выявил регуляторные узлы: аполипопротеины (APOF, CETP, LCAT, LPA), белки острой фазы (SAA1/2) и металлотионеины (MT1F/H/HL1). GO-анализ выявил три ключевых биологических процесса: регуляция уровня цинка, стресс-ответ на токсичные металлы и детоксикация.

Abstract

Transcriptomic analysis of TCGA-LIHC revealed 4 key genes (GCLC, GCLM, GSS, GPX4) linking glutathione metabolism and ferroptosis. Network analysis revealed regulatory nodes: apolipoproteins (APOF, CETP, LCAT, LPA), acute phase proteins (SAA1/2) and metallothioneins (MT1F/H/HL1). GO analysis revealed three key biological processes: zinc regulation, stress response to toxic metals, and detoxification.

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) остается одной из наиболее агрессивных злокачественных опухолей с ограниченными терапевтическими возможностями. В последние годы особое внимание уделяется изучению роли окислительно-восстановительного гомеостаза и ферроптоза в патогенезе ГЦК. Глутатионовая система и ферроптоз тесно взаимосвязаны через общие молекулярные механизмы, однако их интегративная регуляция при ГЦК остается недостаточно изученной. Использование современных биоинформатических подходов для анализа данных TCGA-LIHC позволяет выявить новые патогенетические мишени и биомаркеры заболевания.

Цель исследования — комплексный биоинформатический анализ данных RNA-seq проекта TCGA-LIHC для изучения молекулярных механизмов, связывающих систему глутатионового обмена и регуляцию ферроптоза при ГЦК, с последующей идентификацией потенциальных терапевтических мишеней.

Материалы и методы

В работе использованы данные RNA-seq из проекта TCGA-LIHC. Проведена разделение образцов по медианному уровню экспрессии на группы: гиперэкспрессированные и гипоэкспрессированные. Дифференциальный анализ выполнен в DESeq2 с порогами значимости FDR < 0,05 и |log2FC|>1 с коррекцией Бенджамини — Хохберга. Сетевой анализ проведен с использованием базы STRING (v12.0) с последующей визуализацией и кластерным анализом в Cytoscape (v3.10.3). Функциональная аннотация выполнена пакетом clusterProfiler (v4.10.1), включая GO-анализ биологических процессов. Все расчеты проведены в R (v4.3.2) с использованием специализированных биоинформатических пакетов.

Результаты и обсуждение

Анализ выявил 4 ключевых гена (GCLC, GCLM, GSS, GPX4) на пересечении путей глутатионового метаболизма и ферроптоза. Сетевой анализ (Cytoscape) выделил три ключевых кластера:

– аполипопротеины: APOF, CETP, LCAT, LPA (связь с липидным метаболизмом);
– белки острой фазы: SAA1/SAA2 (воспаление и стресс-ответ);

© А. Е. Чернышева, В. В. Мелехин, 2025

– металлотионеины: MT1F/H/HL1 (гомеостаз металлов и антиоксидантная защита).

Проведенный GO-анализ выявил значимое обогащение биологических процессов, связанных с регуляцией баланса металлов и клеточного стресс-ответа при гепатоцеллюлярной карциноме. В частности, были обнаружены следующие ключевые изменения:

– значительная активация путей, регулирующих уровень цинка (GO:0006882, GO:0055069) и других металлов (GO:0046916, GO:0055076), в которых важную роль играют транспортные белки SLC30A2/3/8 и металлотионеины семейства MT1 (MT1F/H/G/HL1);

– усиление стресс-ответных механизмов на воздействие меди (GO:0046688, GO:1990169) и кадмия (GO:0046686, GO:0071276);

– активация систем детоксикации (GO:0010273, GO:0061687, GO:0098754).

Проведенное исследование позволило выявить ключевые молекулярные механизмы, связывающие систему глутатионового обмена, регуляцию ферроптоза и гомеостаз металлов при гепатоцеллюлярной карциноме. Особое значение имеет центральная роль металлотионеинов MT1, участвующих во всех выявленных процессах и выступающих ключевыми регуляторами как металлического гомеостаза, так и клеточного стресс-ответа. Полученные данные расширяют понимание молекулярных основ ГЦК и открывают новые направления для исследований.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-31

ИЕРАРХИЧЕСКАЯ АННОТАЦИЯ КЛЕТОК И ВЫСОКОТОЧНАЯ ИМПУТАЦИЯ МОДАЛЬНОСТЕЙ ПРИ ПОМОЩИ ИНСТРУМЕНТА SCPARADISE *

SCPARADISE: TUNABLE HIGHLY ACCURATE MULTI-LEVEL CELL TYPE ANNOTATION AND MODALITY IMPUTATION

Е. С. Чечехина, В. И. Чечехин

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E. S. Chechekhina, V. I. Chechekhin

Lomonosov Moscow State University

✉ voynovaes.pharm@gmail.com

Аннотация

scParadise — интегрированный инструмент для комплексного анализа данных РНК-секвенирования одиночных клеток, включающий модули для многоуровневой автоматической аннотации клеток (scAdam), импутации модальностей (scEve) и оценки качества импутации и аннотации (scNoah). Инструмент обеспечивает высокую точность и гибкость для мультимодальных исследований.

Abstract

scParadise is an integrated tool for comprehensive single-cell RNA sequencing data analysis. It includes modules for multi-level automatic cell type annotation (scAdam), modality imputation (scEve), and quality assessment of annotation and imputation (scNoah). The tool delivers high accuracy and flexibility for multimodal studies.

Современный анализ РНК-секвенирования одиночных клеток связан с необходимостью в короткие сроки осуществлять одновременную аннотацию множества датасетов, содержащих разнообразные клеточные типы. Несмотря на многообразие алгоритмов автоматической аннотации, исследователи сталкиваются с рядом проблем. Ключевыми из них являются невысокая точность существующих алгоритмов, трудности идентификации редких популяций клеток, низкая универсальность методов, а также отсутствие стандартизированных подходов к анализу качества аннотаций. Помимо этого, современные датасеты РНК-секвенирования одиночных клеток часто являются мультимодальными. Такой тип данных помимо экспрессии мРНК в клетках также содержит информацию о представленности поверхностных белков и/или открытости хроматина. Мультимодальные датасеты позволяют точнее аннотировать клетки и анализировать их функциональное состояние. Однако мультимодальные исследования являются дорогостоящими и технически сложными. В связи с этим стали развиваться методы импутации модальностей в данные РНК-секвенирования одиночных клеток. Но все они на сегодняшний день связаны с интеграцией данных с референсными мультимодальными датасетами. Использование интеграционных методов для импутации данных ограничены вычислительными мощностями и доступностью референсных данных. Для преодоления ограничений современных методов автоматической аннотации и импутации данных мы разработали новый инструмент — scParadise, объединяющий в себе три полноценных модуля: scAdam, scEve и scNoah.

Модуль scAdam реализует многоуровневую аннотацию клеточных типов — от основных классов до конкретных функциональных состояний клеток. ScAdam превосходит существующие инструменты, такие как CellTypist, scGPT, Seurat, Azimuth, scANVI, TOSICA и Symphony, по сбалансированной точности и некоторым другим метрикам качества на датасетах мононуклеаров периферической крови, поджелудочной и рака гортани человека [1–6]. Помимо этого, scAdam способен осуществлять многоуровневую аннотацию клеток, что не поддерживается ни одним другим нейросетевым автоматическим аннотатором клеток (CellTypist, scGPT, TOSICA). Также scAdam включает более 30 предобученных моделей для разных тканей и биологических видов, что позволяет легко интегрировать инструмент в широкий спектр биологических задач.

Модуль scEve представляет собой инструмент для импутации уровня представленности поверхностных белков в данные РНК-секвенирования одиночных клеток. ScEve не только превосходит интеграционные методы импутации модальностей (например, Seurat, Azimuth) по метрикам ошибки, но и предоставляет возможность

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-75-30005).

© В. И. Чечехин, Е. С. Чечехина, 2025

применения моделей на различных тканях. Так, модель, обученная на мононуклеарах периферической крови человека, успешно выявляет новые функциональные состояния NK-клеток в жировой ткани. Межтканевое применение scEve дает преимущество над интеграционными методами импутации модальностей. Кроме того, модели scEve и scAdam поддерживают различные варианты оптимизации, такие как подбор гиперпараметров и дообучение на новых данных.

Модуль scNoah служит универсальным инструментом для оценки результатов аннотации и импутации модальностей. С его помощью можно проанализировать качество моделей и визуализировать полученные результаты, отображая распределения ошибок для каждой популяции клеток и формируя отчеты с метриками качества аннотации и импутации модальностей.

Таким образом, scParadise представляет собой единый инструмент для анализа данных РНК-секвенирования одиночных клеток. Он расширяет возможности автоматического определения клеточных типов, добавляя иерархическую аннотацию, а также позволяет осуществлять межтканевую импутацию модальностей в данные. ScParadise является пакетом для языка программирования Python и свободно доступен в PyPi для установки. Инструмент сопровождается подробной документацией, что облегчает его интеграцию в существующие биоинформатические пайплайны по анализу данных РНК-секвенирования одиночных клеток. ScParadise опубликован в виде препринта и доступен по ссылке [7].

Литература

1. Domínguez Conde C., Xu C., Jarvis L. B. et al. Cross-tissue immune cell analysis reveals tissue-specific features in humans // Science. 2022. Vol. 376. P. eabl5197.

2. Cui H., Wang C., Maan H. et al. scGPT: toward building a foundation model for single-cell multi-omics using generative AI // Nature Methods. 2024. Vol. 21. P. 1–11.

3. Chen J., Xu H., Tao W. et al. Transformer for one stop interpretable cell type annotation // Nature Communications. 2023. Vol. 14. P. 223.

4. Butler A., Darby C., Hao Y. et al. Azimuth: A Shiny App Demonstrating a Query-Reference Mapping Algorithm for Single-Cell Data. 2023.

5. Gayoso A., Lopez R., Xing G. et al. A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data // Nature Biotechnology. 2022. Vol. 40. P. 163–166.

6. Hao Y., Stuart T., Kowalski M. H. et al. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis // Nature Biotechnology. 2024. Vol. 42. P. 293–304.

7. Chechekhina E., Tkachuk V., Chechekhin V. scParadise: Tunable highly accurate multi-task cell type annotation and surface protein abundance prediction // bioRxiv. 2024. URL: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.09.23.614509v1.full.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-32

СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ ОТ БАКТЕРИОФАГОВ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИЙ РОДА *METHYLOCOCCUS* *

ANTIPHAGE DEFENCE SYSTEMS IN *METHYLOCOCCUS* BACTERIAL GENUS

А. А. Чигирева[1], А. Е. Коренская, А. В. Резайкин[2,3], И. О. Стародумов[2], И. Г. Низовцева[2]

[1] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*
[2] *Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург*
[3] *Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург*

A. A. Chigireva[1], A. E. Korenskaia, A. V. Rezaykin[2,3], I. O. Starodumov[2], I. G. Nizovtseva[2]

[1] *Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow*
[2] *Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg*
[3] *Ural State Medical University, Yekaterinburg*

✉ cigirevaalina23@gmail.com

Аннотация

В данной работе было проанализировано 9 геномов рода *Methylococcus*, в результате чего выявлено от 8 до 16 систем защиты в каждом из штаммов. Некоторые защитные механизмы оказались уникальны для отдельных штаммов, что, вероятно, свидетельствует об их недавнем приобретении в ходе горизонтального переноса.

Abstract

In this work, 9 genomes of the genus *Methylococcus* were analyzed, as a result of which 8 to 16 protection systems were identified in each of the strains. Some protective mechanisms turned out to be unique for individual strains, which probably indicates their recent acquisition during horizontal transfer.

В ответ на угрозу заражения бактериофагами бактерии разработали широкий спектр защитных систем. Эти системы функционируют по различным механизмам — от ингибирования роста и индукции апоптоза при заражении или стрессе до распознавания и разрушения чужеродных последовательностей, включая профаговые элементы [1]. Изучение защитных механизмов у бактерий рода *Methylococcus* представляет особый интерес, поскольку данный род включает промышленные штаммы, используемые для получения белка на основе метана [2]. Заражение фагами или самопроизвольная индукция апоптоза у таких штаммов может привести к срыву производственного процесса.

В рамках настоящего исследования были проанализированы 9 геномов представителей рода *Methylococcus*. В результате для каждого штамма было выявлено от 8 до 17 систем защиты. Наиболее распространенными оказались механизмы, обеспечивающие защиту путем распознавания и разрушения чужеродных последовательностей: во всех геномах обнаружены системы CRISPR-Cas и рестрикции-модификации типа I. Также почти у половины штаммов присутствовали системы BREX (bacteriophage exclusion), SoFic и рестрикции-модификации типа III. У некоторых штаммов были найдены системы, контролирующие целостность клеточного аппарата и вызывающие гибель клетки при инфицировании — в том числе токсин-антитоксинные системы и Abi-системы (абортивной инфекции). Некоторые защитные механизмы оказались уникальны для отдельных штаммов, что, вероятно, свидетельствует об их недавнем приобретении в ходе горизонтального переноса.

Наибольшее число защитных систем было выявлено у штаммов McNor, Mc7 и KN2 — 15, 17 и 16 соответственно. Ряд систем, встречающихся наиболее часто среди большинства штаммов, в том числе AbiE, BREX_III, CAS_Class1-Subtype-I-E, CBASS_I, RM_Type_I, RM_Type_II, RM_Type_III и SoFic, были дополнительно проанализированы на предмет их возможного синергичного действия. У всех штаммов, кроме IM1, выявлено хотя бы по одной паре совместно встречающихся систем, что может указывать на их согласованную работу в условиях фаговой атаки.

Анализ гомологии генов, кодирующих элементы защитных систем, позволил выделить характерные для рода *Methylococcus* подтипы и определить штаммы, обладающие потенциально синергичными комбинациями механизмов защиты. Эти результаты представляют интерес для дальнейших исследований, направленных на повышение общей устойчивости клеток к бактериофагам.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-24-00454).

© А. А. Чигирева, А. Е. Коренская, А. В. Резайкин, И. О. Стародумов, И. Г. Низовцева, 2025

Таким образом, полученные данные могут быть использованы для селекции и оптимизации штаммов с повышенной фагорезистентностью в рамках биотехнологических производств.

Литература

1. Héloïse Georjon, Aude Bernheim. The Highly Diverse Antiphage Defence Systems of Bacteria // Nature Reviews Microbiology. 2023. Vol. 21 (10). P. 686–700.

2. Nizovtseva I., Rezaykin A., Korenskaia A. et al. Identification and comparative genomic analysis of prophage sequences and CRISPR-Cas immunity in Methylococcus genomes: insights for industrial methane bioconversion // PLOS Computational Biology. 2025 (in print).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-33

ЭФФЕКТ ЗАМЕН ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА НА АЛАНИН В БОЛЬШОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ ДОМЕНЕ ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B НА ЕГО ПРОСТРАНСТВЕННУЮ СТРУКТУРУ

THE EFFECT OF REPLACING CYSTEINE RESIDUES WITH ALANINE IN THE LARGE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE NAPI2B TRANSPORTER ON ITS SPATIAL STRUCTURE

А. Р. Шайдуллина, Н. И. Акберова

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

A. R. Shaidullina, N. I. Akberova

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ seuta21@gmail.com

Аннотация

В работе изучено влияние замен остатков цистеина на аланин в большом внеклеточном домене NaPi2b методами молекулярной динамики. Показано, что мутации изменяют конформационную подвижность, площадь поверхности и компактность домена, что связано с перестройкой дисульфидных связей и может влиять на доступность терапевтического эпитопа.

Abstract

The effect of cysteine-to-alanine substitutions in the large extracellular domain of NaPi2b was studied using molecular dynamics. The mutations altered conformational mobility, surface area, and domain compactness due to rearrangement of disulfide bonds, potentially affecting the accessibility of the therapeutic epitope.

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b (SLC34A2) сверхэкспрессируется в ряде злокачественных новообразований и рассматривается как перспективная мишень для таргетной терапии. Во внеклеточном домене (ВКД) белка локализован иммуногенный эпитоп, распознаваемый моноклональными антителами. В положениях 303, 322, 328 и 350 ВКД присутствуют остатки цистеина, предположительно участвующие в образовании дисульфидных связей, которые влияют на пространственную организацию домена и доступность эпитопа.

Цель работы — оценить влияние замен остатков цистеина в ВКД NaPi2b на конформацию ВКД NaPi2b методами молекулярной динамики (МД).

В качестве исходной модели использовали структуру NaPi2b, предсказанную AlphaFold (AF-O95436-F1). Мутации вносили в Swiss-PdbViewer, получили четыре системы с одиночными заменами (C303A, C322A, C328A, C350A) и три с двойными (C303A-C322A, C303A-C328A, C322A-C328A). Модели встраивали в бислой POPC с добавлением Na^+/Cl^- (CHARMM-GUI), окружали водой и ионами Na и Cl. Симуляции равновесной молекулярной динамики (30 нс для каждой системы) выполняли в NAMD с использованием силового поля CHARMM36. Анализ МД-траекторий (VMD, bio3d R) включал сравнение значений среднеквадратичного отклонения (RMSD), флуктуации (RMSF), площади поверхности, доступной для растворителя (SASA), радиуса гирации (Rg), анализ главных компонент (PCA) и расстояний между атомами серы в остатках цистеина.

Все замены, кроме C322A, изменяли RMSD ВКД ($p < 1{,}2 \times 10^{-7}$); наибольшее увеличение наблюдалось при C350A ($p < 2 \times 10^{-16}$). В эпитопе изменения RMSD фиксировали во всех системах, кроме C328A ($p < 1{,}9 \times 10^{-5}$). RMSF ВКД в целом изменялся слабо, исключение — эпитоп, где все мутации, кроме C328A, вызывали значимые флуктуации ($p < 5{,}7 \times 10^{-4}$). SASA ВКД снижался во всех вариантах ($p < 2 \times 10^{-16}$), кроме C328A и C350A, где в эпитопе регистрировалось увеличение SASA. Компактность ВКД (Rg) сохранялась при C322A, C303A-C322A и C322A-C328A; в остальных случаях наблюдались значимые изменения ($p < 2 \times 10^{-16}$). В эпитопе Rg изменялся во всех системах, кроме C303A и C328A. PCA показал наибольшую подвижность ВКД и N-/C-концевых доменов, с характерными движениями в районе эпитопа. Анализ расстояний между атомами серы подтвердил возможность образования связей C303-C350, C322-C328 и C303-C328; при замене C350A образование дисульфидных связей маловероятно.

Результаты подтверждают критическую роль дисульфидных связей в стабилизации ВКД NaPi2b и сохранении его иммуногенных свойств. Полученные данные могут быть использованы для оценки конформационной доступности эпитопа MX35 и разработки терапевтических антител.

© А. Р. Шайдуллина, Н. И. Акберова, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-34

ПРЕДСКАЗАНИЕ САЙТОВ ПОСАДКИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ ПО АМИНОКИСЛОТНЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

PREDICTION OF TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES BY AMINO ACID SEQUENCES OF PROTEINS USING ARTIFICIAL INTELLIGENCE METHODS *

Н. А. Шелудяков[1], П. С. Деменков[2]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

N. A. Sheludyakov[1], P. S. Demenkov[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

✉ n.sheludyakov@g.nsu.ru

Аннотация

В работе представлен прототип инструмента Prot2Motif, позволяющий по аминокислотной последовательности транскрипционного фактора предсказывать мотивы сайтов посадки на ДНК. Основа модели — рекуррентная нейронная сеть, позволяющая работать как с биологическими последовательностями, так и с их матричными представлениями.

Abstract

A prototype of the Prot2Motif tool is presented in this work. Prot2Motif enables the prediction of DNA binding site motifs based on the amino acid sequence of a transcription factor. The core of the model is a recurrent neural network, which can process both biological sequences and their matrix representations.

В последние десятилетия биоинформатика стала передовой областью научных исследований, которые предоставляют новые возможности для понимания генетической основы жизни. Одна из задач данной области — поиск сайтов посадки транскрипционных факторов (СПТФ). Транскрипционные факторы (ТФ) — это белки, контролирующие первый этап экспрессии генов. СПТФ — это короткие последовательности нуклеотидов длиной от 5 до 30 нуклеотидов, которые распознаются специальными ДНК-связывающими доменами ТФ. Поиск таких коротких последовательностей позволяет лучше понимать процесс регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции.

Существует множество как экспериментальных методик, так и вычислительных инструментов, позволяющих решать данную задачу. Однако инструменты *in silico* могут предсказывать сайты только на основе априорной информации о нуклеотидной последовательности. Поэтому мы разработали прототип инструмента Prot2Motif, который может предсказать сайты посадки исходя из первичной структуры белка. Основа модели — рекуррентная нейронная сеть (RNN), позволяющая генерировать последовательности нуклеотидов.

Наш инструмент включает в себя несколько компонентов. Первым звеном является модель ESM-2 (Evolutionary Scale Modeling), которая переводит последовательность аминокислот в вектора (эмбеддинги). Второе звено — InterProScan, необходимый для поиска ДНК-связывающего домена в белке. Третий компонент — рекуррентная нейронная сеть, позволяющая генерировать частоты встречаемости нуклеотидов в позициях.

В качестве набора данных по мотивам сайтов связывания была взята база данных HOCOMOCO v13. Информация о первичной структуре белков была извлечена из баз данных UniProt и TFclass.

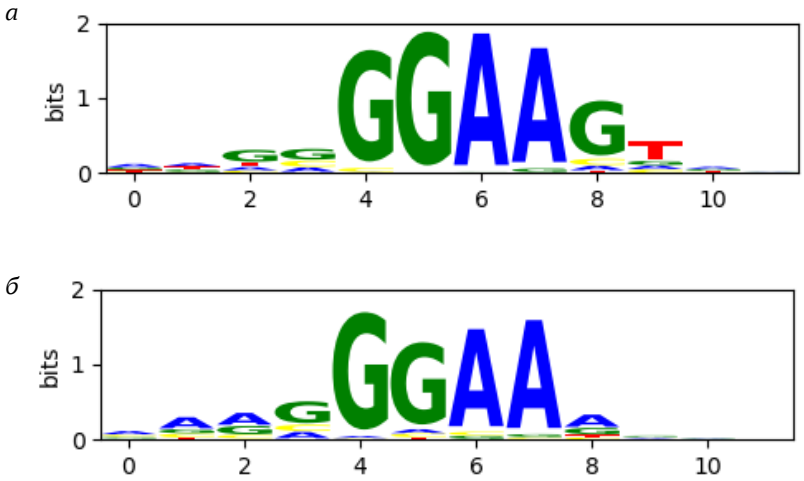
Для оценки качества нейронной сети была выбрана оценка SWscore [1], выражаемая формулой

$$\mathrm{SWscore} = \frac{\sum_{i=1}^{m}\left(2 - \sum_{j\in\{A,C,G,T\}}\left(A_{ij} - B_{ij}\right)^2\right)}{2m},$$

где m — длина мотива (m = 25); A_{ij} — вероятность нуклеотида j в позиции i исходной матрицы; B_{ij} — вероятность нуклеотида j в позиции i сгенерированной матрицы. Оценка SWscore может принимать значения от 0 до 1, где 1 — точное совпадение.

© Н. А. Шелудяков, П. С. Деменков, 2025

После обучения модели RNN качество предсказания на тестовой выборке составило 0,792, что свидетельствует о возможности модели находить взаимосвязи между структурой мотива сайта посадки и ДНК-связывающего домена белка. На рисунке представлен пример референсного и предсказанного мотива.



а — референсное LOGO-представление SPI1.H13CORE.1.S.B;
б — предсказанное LOGO-представление. Белок — Uniprot ID: P17947

В процессе обучения и оценки качества генерации замечено, что модель способна определять консервативность нуклеотидов в позициях — это выражается в корректном выборе наиболее часто встречаемого нуклеотида.

На сегодняшний день проводится оптимизация процесса обучения нейронной сети, что позволит улучшить качество генерации мотивов сайтов связывания.

Литература

1. Sandelin A., Wasserman W.W. Constrained Binding Site Diversity within Families of Transcription Factors Enhances Pattern Discovery Bioinformatics // Journal of Molecular Biology. 2004. Vol. 338, No. 2. P. 207–215.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-35

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КСАНТОТОКСИНА С ЭФФЕКТОРНЫМИ КАСПАЗАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

STUDY OF THE INTERACTION OF XANTHOTOXIN WITH EFFECTOR CASPASES BY MOLECULAR DOCKING

Е. Е. Шестакова, Н. Ю. Часовских, П. Д. Осадчая

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

E. E. Shestakova, N. Yu. Chasovskikh, P. D. Osadchaya

Siberian State Medical University, Tomsk

✉ evgenika06@gmail.com

Аннотация

В работе исследуется взаимодействие ксантотоксина с ключевыми белками апоптоза — эффекторными каспазами 3, 6 и 7. При помощи метода молекулярного докинга показано, что ксантотоксин способен формировать стабильные комплексы с исследуемыми каспазами. Полученные результаты указывают на потенциальное влияние ксантотоксина на реализацию апоптотической гибели клеток.

Abstract

The work studies the interaction of xanthotoxin with key apoptosis-related proteins — effector caspases 3, 6 and 7. Using the molecular docking method, it was shown that xanthotoxin is able to form stable complexes with the studied caspases. The results suggest a potential role of xanthotoxin in the execution of apoptotic cell death.

Апоптоз — это регулируемый процесс программируемой гибели клеток, необходимый для поддержания клеточного гомеостаза и предотвращения опухолевого роста. Ключевую роль в запуске апоптоза играют каспазы — цистеиновые протеазы, реализующие расщепление внутриклеточных белков и запускающие механизмы клеточной смерти [1]. Нарушения в реализации данного процесса ассоциированы с онкологическими, нейродегенеративными и аутоиммунными заболеваниями [2].

Известно, что противоопухолевыми, проапоптотическими и фотосенсибилизирующими свойствами обладает ксантотоксин (8-метоксипсорален) из группы фуранокумаринов [3]. В исследовании на различных линиях опухолевых клеток показано, что ксантотоксин активирует апоптоз посредством каспазы-3 (особенно в клеточной линии рака желудка) [4], однако молекулярные механизмы этого явления остаются неизученными.

В настоящее время для прогнозирования биологической активности веществ применяют *in silico* методы исследования, в частности моделирование связывания лигандов с белковыми мишенями — молекулярный докинг. Данный метод на начальных этапах исследования позволяет оценить возможность связывания лиганда с активным центром белка и определить аминокислоты, с которыми происходит связывание. Молекулярный докинг применяют и для исследования механизмов апоптоза, в частности, в работе E. M. El-Sheref и соавторов проведено моделирование взаимодействия 1,2,3-триазол-бикуинолин-2-онов к активному центру каспазы 3 для оценки возможности использования данных лигандов в качестве антиапоптотических агентов [5].

Целью данной работы является исследование взаимодействий ксантотоксина с белками пути апоптоза (каспазами 3, 6, 7) и оценка его потенциального влияния на программируемую гибель клеток.

Структуры каспазы 3 (ID PDB: 2j31), 6 (ID PDB: 3k7e) и 7 (ID PDB: 1k86) извлечены из банка данных белков PDB, структура ксантотоксина (ID PubChem: 1441) отобрана из базы данных химических соединений и смесей PubChem. Для подготовки структур каспаз к докингу применяли PyMOL v. 2.5, для конвертации ксантотоксина в формат pdb использовали OpenBabel. Молекулярный докинг проводили в программе Autodock 4.2.6, веб-сервис fpocket 2.0 [6] использовали для анализа связывающих карманов белков, MGLTools-1.5.6 и PyMOL м. 2.5 применяли для визуализации и оценки результатов.

В результате проведенного молекулярного докинга каспазы 3 и ксантотоксина получен комплекс с энергией связывания −5,20 кДж/моль, каспазы 6 и ксантотоксина — −6,09 кДж/моль, каспазы 7 и ксантотоксина — −6,69 кДж/моль.

© Е. Е. Шестакова, Н. Ю. Часовских, П. Д. Осадчая, 2025

Согласно результатам молекулярного докинга, ксантотоксин способен взаимодействовать с каспазами 3, 6 и 7 с образованием стабильных комплексов. Полученные результаты показывают потенциальное влияние ксантотоксина на процесс апоптоза, что обуславливает необходимость дальнейших экспериментальных исследований для подтверждения гипотезы.

Литература

1. Шишкина В. В., Мошуров И. П., Герасимова О. А. и др. Семейство каспаз: молекулярные основы взаимодействия при апоптозе и пироптозе // Гены и Клетки. 2024. Т. 19, № 1. С. 153–168.

2. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. Vol. 20, No. 3. P. 175–193.

3. Wu A., Lu J., Zhong G. et al. Xanthotoxin (8-methoxypsoralen): A review of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity // Phytother Res. 2022. Vol. 36, No. 10. P. 3805–3832.

4. Choi E. K., Kim H. D., Park E. J. et al. 8-Methoxypsoralen induces apoptosis by upregulating p53 and inhibits metastasis by downregulating MMP-2 and MMP-9 in human gastric cancer cells // Biomol. Ther. (Seoul). 2023. Vol. 31, No. 2. P. 219–226.

5. El-Sheref E. M., Aly A. A., Alshammari M. B. et al. Design, synthesis, molecular docking, antiapoptotic and caspase-3 inhibition of new 1,2,3-triazole/bis-2(1H)-quinolinone hybrids // Molecules (Basel, Switzerland). 2020. Vol. 25, No. 21. P. 5057.

6. Le Guilloux V., Schmidtke P., Tuffery P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection // BMC Bioinformatics. 2009. Vol. 10. P. 168.

РАЗДЕЛ II

БИОТЕХНОЛОГИИ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-36

IN VITRO REGENERATION OF *RHODIOLA ROSEA* FROM ROOT EXPLANTS

T.A. Ak-Lama[1], A.A. Erst[1,2]

[1] *Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Ningbo Osaki Biotech Co., Ltd., China*

✉ annaerst@yandex.ru

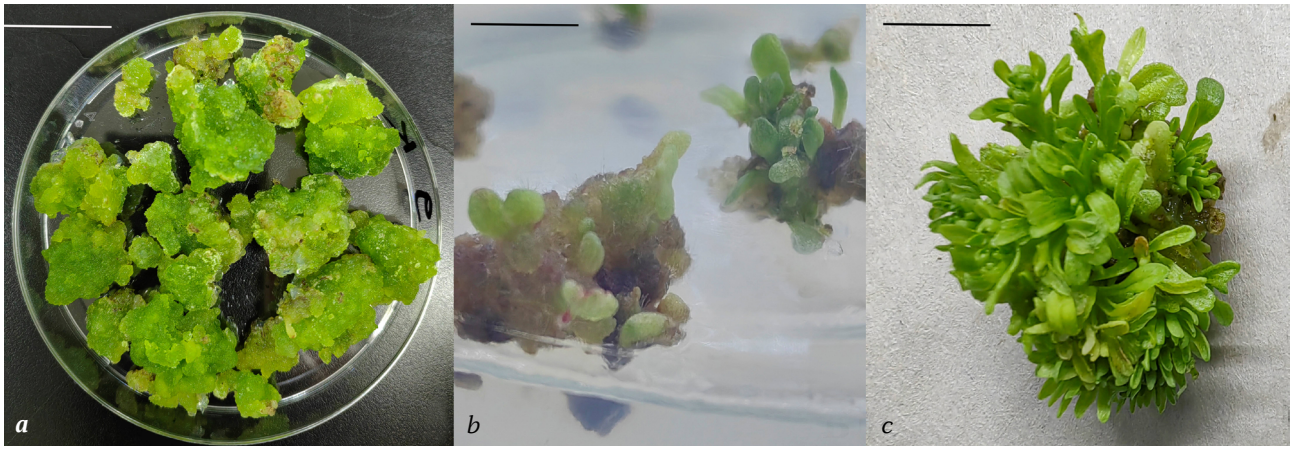
Abstract

The regeneration protocol developed in this study provides a basis for germplasm conservation and for further investigation of medicinally active constituents of the rare medicinal plant *Rhodiola rosea*.

Rhodiola rosea L. is a widely used medicinal plant in traditional medicine across northern countries, Eastern Europe, and Asia. It is prized for its beneficial effects, including stimulation of the nervous system, enhancement of physical and mental performance, alleviation of fatigue, and reduction of depression. Over 140 chemical compounds have been identified in the roots and rhizomes of *R. rosea*, with rosavins and salidroside being the primary active constituents [1].

Although this species is listed in the Red Book of the Russian Federation, the high commercial value and strong demand on both Russian and global markets have led to continued illegal harvesting from wild populations. In vitro propagation techniques offer an effective approach for the mass reproduction and conservation of the genetic resources of many endangered plant species [2].

In vitro regeneration has been successfully achieved for numerous medicinal and aromatic plants, including several species within the genus *Rhodiola* [3]. Specifically, shoot regeneration from leaf explants of *Rhodiola* species has been well documented [4–7]. However, to date, there are no reports describing shoot regeneration of *R. rosea* from root



Shoot regeneration and callus formation in *R. rosea* in vitro culture: *a* — non-morphogenic callus from leaf explant on MS medium supplemented with 5 μM TDZ and 5 μM NAA (Bar: 20 mm); *b* — adventitious shoots from root explant on MS medium supplemented with 5 μM TDZ and 5 μM NAA (Bar: 5 mm); *c* — adventitious shoots on MS medium supplemented with 0.5 μM TDZ (Bar: 10 mm)

© T.A. Ak-Lama, A.A. Erst, 2025

explants. Root explants present several advantages over other explant types, including higher regeneration capacity and greater susceptibility to *Agrobacterium*-mediated transformation.

The objective of this study is to establish an efficient in vitro propagation protocol for *R. rosea* utilizing root explants.

In this study, sterile *R. rosea* sprouts were used and divided into two types of explants: root and cotyledon leaf. Our results demonstrated that Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 5 μM thidiazuron (TDZ) and 5 μM α-naphthylacetic acid (NAA) induced shoot regeneration in 86 % of sterile root explants. The multiplication coefficient reached 5.27 shoots per explant (see figure, *b*). In contrast, cotyledon leaf explants resulted only in callus formation without shoot regeneration (see figure, *a*). Subsequent two-stage cultivation of the regenerated microshoots — first on MS medium containing 5 μM TDZ for 2 weeks, followed by transfer to medium with reduced cytokinin concentration (0.5 μM) — promoted prolific shoot proliferation, yielding clusters of shortened microshoots averaging 47.13 shoots per explant (see figure, *c*).

In summary, an efficient regeneration system for *R. rosea* from root explants was successfully developed. Adventitious shoots formed on MS medium supplemented with 5 μM TDZ and 5 μM NAA. The rapid regeneration protocol established in this study provides a reliable source of explants for large-scale micropropagation, conservation of genetic resources, and further investigation of the medicinal active compounds of this valuable and rare species.

References

1. Erst A.A., Kotsupiy O.V., Erst A.S., Kuznetsov A.A. Individual differences in growth and in accumulation of secondary metabolites in Rhodiola rosea cultivated in Western Siberia // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, No. 14. P. 11244.

2. Hasnain A., Naqvi S.A. H., Ayesha S.I. et al. Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches // Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 13. P. 1009395.

3. Dimitrov B., Tasheva K., Zagorska N., Evstatieva L. In vitro cultivation of Rhodiola rosea L. // Genetics and Breeding. 2003. Vol. 32, No. 1–2. P. 3–6.

4. Ki Hwa B., Ji Y., Eui Soo Y. Effect of growth regulators of plant regeneration from Rhodiola sachalinesis leaf segments // Korean Journal of Plant Resources. 2005. Vol. 18, No. 3. P. 410–416.

5. Liu H.J., Xu Y.A. N., Liu Y.J., Liu C.Z. Plant regeneration from leaf explants of Rhodiola fastigiata // In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 2006. Vol. 42. P. 345–347.

6. Bhardwaj A.K., Naryal A., Bhardwaj P. et al. High efficiency in vitro plant regeneration and secondary metabolite quantification from leaf explants of Rhodiola imbricata // Pharmacognosy Journal. 2019. Vol. 10, No. 3.

7. Matvieieva N., Belokurova V., Ratushniak Y. et al. In vitro direct shoot regeneration from Rhodiola rosea L. leaf explants // Biotechnologia Acta. 2023. Vol. 16, No. 3. P. 45–50.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-37

ALL-DNA SHORT OLIGONUCLEOTIDE STAPLE (SOS) PROBE FOR FLUORESCENT REPORTING OF DOUBLE STRANDED DNA ANALYTE AT LOW TEMPERATURES

M. Ateiah[1,2], D. M. Kolpashchikov[3,4]

[1] *Laboratory of DNA-Nanosensor Diagnostics, ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Laboratory of Amyloid Biology, Saint Petersburg State University*
[3] *Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA*
[4] *Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA*

✉ muhannad@scamt-itmo.ru

Abstract

Hybridization of probe to dsDNA is thermodynamically unfavorable and achieved by thermal denaturation of dsDNA or by using DNA analogs with increased affinity. We designed all-DNA probe that binds dsDNA analyte and produces fluorescent signal only at low temperatures. It can be designed to differentiate single base pair difference in dsDNA analyte with modest differentiation factor. The Limit of detection of the probe is 2 nM after 3h of incubation at 4 °C.

Probe hybridization to single-stranded DNA or RNA is thermodynamically favorable, as the formation of Watson–Crick base pairs stabilize the resulting complex [1]. However, the binding of a hybridization probe to double-stranded DNA (dsDNA) presents a significant thermodynamic challenge [2]. When a probe binds to dsDNA, the number of newly formed base pairs is less than or equal to the number of disrupted base pairs, as the unpaired fragment of the original duplex opposes the bound probe. Moreover, probe binding to dsDNA results in an unfavorable entropy change, as it reduces the configurational entropy of the system. Consequently, $\Delta G°$ for probe/dsDNA complex formation is typically positive, rendering spontaneous hybridization unfavorable under standard conditions.

Probe hybridization to dsDNA is typically achieved by thermal denaturation of dsDNA in the presence of excess amounts of a hybridization probe or by using DNA analogs with increased affinity to DNA including Peptide Nucleic Acid (PNA) and Locked Nucleic Acid (LNA) -based probes [3, 4]. Here, we present an alternative strategy for sequence-specific recognition of dsDNA under non-denaturing conditions. Our approach is based on a multicomponent sensor composed of short oligonucleotide staple (SOS) strands designed to invade dsDNA by thermodynamically favoring complex formation at low temperature.

$G = H - TS$. The entropy factor has reduced contribution to the G of complex formation at reduced temperatures. Therefore, theoretically, the lower the temperature, the higher the probability of complex formation between SOS sensor and dsDNA. Unlike conventional approaches, the SOS sensor does not rely on denaturing conditions, chemical modification, or protein-based invasion. Instead, the binding is driven by the net gain in base pairing: upon hybridization, the cumulative number of base pairs formed between SOS and the target DNA exceeds the number of disrupted base pairs within the duplex. The SOS sensor forms 58 base pairs upon target invasion while displacing only 20 base pairs of the target duplex. This design enables dsDNA invasion and stable probe–dsDNA complex formation at 4 °C.

The SOS sensor is also designed to trigger fluorescence via a target-induced conformational change in a universal molecular beacon (UMB). The SOS comprises four strands; among them, two (SOS-A and SOS-B) are engineered with dual functionality: each contains a dsDNA-binding arm and a UMB-binding arm connected by a flexible hexaethylene glycol (HEG) linker. Upon successful invasion of the target duplex, the UMB-binding arms stabilize the open conformation of the beacon, disrupting the stem-loop structure and separating the fluorophore from the quencher. This conformational switch results in a fluorescence turn-on signal that directly correlates with invasion efficiency and is applicable to studies both at equilibrium and near-equilibrium (time-dependent) conditions. The SOS sensor achieved a signal-to-background (S/B) ratios of 2.6 and 5.1, after 1 and 3 h of incubation at 4 °C, respectively. The limit of detection was found to be 2 nM after 3 h of incubation.

This work presents a novel design concept for all-DNA SOS sensor capable of sequence-specific dsDNA recognition under non-denaturing conditions. By leveraging thermodynamically favorable binding at low temperatures, the sensor achieves stable duplex invasion and fluorescence-based detection without chemical modification or thermal denaturation. With a detection limit of 2 nM and the ability to differentiate single base pair mismatches, the SOS sensor offers a simple and effective platform for DNA diagnostics.

© M. Ateiah, D. M. Kolpashchikov, 2025

References

1. Pierce K. E., Wangh L. J. LATE-PCR and allied technologies: real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells // Methods in Molecular Biology. 2011. Vol. 688. P. 47–66.

2. Stancescu M., Fedotova T. A., Hooyberghs J. et al. Non-equilibrium hybridization enables discrimination of a point mutation within 5–40 °C // Journal of the American Chemical Society. 2016. Vol. 138. P. 13465–13468.

3. Muangkaew P., Vilaivan T. Modulation of DNA and RNA by PNA // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2020. Vol. 30. P. 127064.

4. Veedu R. N., Wengel J. Locked nucleic acids: promising nucleic acid analogs for therapeutic applications // Chemistry & Biodiversity. 2010. Vol. 7. P. 536–542.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-38

HPLC-BASED IDENTIFICATION OF GOSSYPOL AS A PHYTOALEXIN IN SELECTED COTTON (*GOSSYPIUM HIRSUTUM* L.) VARIETIES UNDER BIOTIC STRESS CONDITIONS

G. H. Bakhromova, M. A. Pattaeva, B. A. Rasulov

Institute of Genetics and Experimental Plant Biology AS RUz, Tashkent, Uzbekistan

✉ gulirukhbakhromova@gmail.com

Abstract

Gossypol, a sesquiterpenoid phytoalexin, plays a significant role in the defense response of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) against biotic stress factors. In this study, six cotton varieties (*Gulbahor-2, Bukhara-102, Afsona, Sadaf, UzRFA-710, and UzRFA-709*) were evaluated under four treatment conditions: control (untreated), inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *Azotobacter chroococcum* K2020, and a combined inoculation of both microbes.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was employed to identify and quantify gossypol content as a biochemical marker of induced resistance. The chromatographic analysis was carried out using an Agilent-1200 HPLC system equipped with a diode-array detector (DAD) at 254 nm. Preliminary results indicated that *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* inoculation significantly increased gossypol synthesis compared to the control. In contrast, *Azotobacter chroococcum* K2020 treatment showed a suppressive effect, reducing gossypol accumulation in most varieties. Interestingly, combined inoculation resulted in an intermediate gossypol level, suggesting microbial interaction effects on phytoalexin pathways.

Among the six cultivars of *Gossypium hirsutum* L. evaluated, the *Afsona* variety was selected for in-depth HPLC-based analysis of gossypol synthesis under various biotic treatments. Chromatographic and quantitative data revealed notable differences in gossypol accumulation depending on microbial inoculation.

In the control group, gossypol concentration was **1.17 mg/g**, representing the basal level of phytoalexin production under non-stress conditions. This served as a reference point for assessing the relative effects of microbial treatments.

In plants inoculated with *Azotobacter chroococcum* K2020, gossypol levels significantly decreased to **0.86 mg/g,** indicating the immunomodulatory influence of this beneficial microbe. *Azotobacter* appears to downregulate the stress-induced biosynthesis of secondary metabolites, including phytoalexins such as gossypol. This response may reflect a strategy to maintain physiological balance and avoid unnecessary metabolic expenditure in the absence of severe pathogenic threat. Thus, *Azotobacter* modulates the plant's defense metabolism and prevents overactivation of stress responses.

In contrast, inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* resulted in the highest gossypol content (**1.84 mg/g**), reflecting a strong activation of the plant's innate immune system. This elevated synthesis of gossypol is indicative of a typical resistance response against fungal pathogen invasion.

The most notable finding emerged in the combined treatment (*Azotobacter* + *Fusarium)*, where gossypol content reached **1.25 mg/g**, representing an intermediate level. This suggests a complex biological interaction between the two microorganisms. While *Fusarium* acted as a pathogenic elicitor triggering the defense response, *Azotobacter* appears to have partially attenuated this reaction through its immunomodulatory effect. As a result, gossypol synthesis was enhanced relative to the control but remained lower than in the *Fusarium*-only treatment.

Overall, the study demonstrates that gossypol biosynthesis is not solely driven by pathogen exposure but is also significantly shaped by the presence of beneficial microbes. This has important implications for developing biotechnological strategies aimed at optimizing plant defense responses through microbial inoculants.

Gossypol content and HPLC peak characteristics in *Afsona* cotton variety under different biotic treatments

Treatment Variant	Retention Time (min)	Peak Area (mAU·s)	Gossypol Concentration (mg/g)
Control	12.728	4310.17	1.1747
Azotobacter chroococcum K2020	12.720	3149.73	0.8584
Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum	12.733	6759.81	1.8423
Combined treatment	12.684	4585.50	1.2497

© G. H. Bakhromova, M. A. Pattaeva, B. A. Rasulov, 2025

The results of this study demonstrate that gossypol, a key phytoalexin in *Gossypium hirsutum* L., is differentially synthesized in response to various microbial treatments. Among the tested conditions, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* elicited the strongest defense response, resulting in the highest gossypol levels. In contrast, *Azotobacter chroococcum* K2020 suppressed gossypol synthesis, likely through immunomodulatory activity that attenuates unnecessary stress responses. Interestingly, the combined treatment produced intermediate results, suggesting a balance between elicitation and suppression mechanisms.

These findings underscore the complex nature of plant–microbe interactions and the importance of understanding how beneficial microorganisms can modulate defense pathways. The use of HPLC as a sensitive tool for phytoalexin quantification proved effective in assessing the biochemical basis of induced resistance. This approach could be valuable for screening cotton genotypes with improved resilience and for developing sustainable biotechnological strategies aimed at enhancing crop protection.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-39

ENGINEERED *E. COLI* NISSLE 1917 PRODUCING AZURIN FOR TARGETED COLORECTAL CANCER THERAPY

N. Deeb, G. D. Otinov, E. Mouhammad, E. I. Koshel

SCAMT Laboratory, ITMO University, Saint Petersburg

✉ nairouz.deeb@gmail.com

Abstract

Azurin is a redox-active bacterial protein with selective antitumor activity through stabilization of p53 and suppression of oncogenic signals. We designed *E. coli* Nissle 1917 to express and secrete azurin under the control of lacUV5 and P_vhb promoters with the pelB signaling peptide. Future work aims to explore synergetic effects of co-delivering azurin with additional pro-apoptotic proteins.

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related deaths. The effectiveness of standard chemotherapy is limited by its systemic toxicity [1]. Protein-based therapeutics offers an alternative approach with higher specificity and lower side effects [2], but their clinical application is hindered by instability and delivery problems, especially with oral administration [2, 3]. A promising strategy is to use genetically modified bacteria to guide the delivery of antitumor proteins directly to the tumor area. The probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is able to selectively colonize colon tumors when administered orally [4]. Clinical studies have shown that EcN accumulates significantly more in colon tumor tissue than in healthy tissue [1, 4]. The EcN strain lacks virulence factors and is rapidly cleared from healthy organs because of its serum-sensitive LPS, thus the strain is nonpathogenic and highly safe [5]. These properties make EcN an attractive platform for targeted microbial therapy of colorectal cancer.

Azurin is a copper–containing protein (~ 14 kDa) isolated from *Pseudomonas aeruginosa*, which is considered a potent antitumor agent. It selectively penetrates cancer cells and induces their apoptosis. Azurin has demonstrated cytotoxicity against a wide range of malignancies, including melanoma, breast, lung, ovarian, and colorectal cancers [6]. Azurin engages with key tumor-suppressive pathways, for example, it forms a complex with the p53 protein, preventing ubiquitin-dependent degradation of this tumor suppressor. In addition, azurin inhibits angiogenesis by blocking signal transmission through VEGFR2 [7]. The combination of these effects leads to inhibition of tumor growth and regression, showcasing the capabilities of azurin.

In this work, we engineered an *E. coli* Nissle 1917 strain to produce and secrete azurin for targeted CRC therapy. We constructed plasmids carrying the mature azurin gene under the control of two types of promoters: (1) lacUV5 (with a Lac operator) for induced expression and (2) P_vhb (a promoter from the *Vitreoscilla* hemoglobin gene) for activity under hypoxic conditions typical of the tumor microenvironment. To ensure the secretion of the target protein outside the bacterial cell, its N-terminal region was fused with the pelB signaling peptide, which directs azurin into the periplasm subsequently outside the cell. We validated the expression of azurin in *E. coli* strain BL21(DE3) at 37 °C (using an expression plasmid based on pET303), observing a high level of protein synthesis. Experiments are currently underway to evaluate the effectiveness of azurin secretion by the EcN engineered strain and its cytotoxic effect on colorectal cancer cell cultures (HCT116, Caco-2).

Furthermore, we plan to investigate synergistic anti-cancer strategies through the combined delivery of azurin with other pro-apoptotic proteins. Such proteins include PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), a member of the Bcl-2 family, a key initiator of the internal (mitochondrial) pathway of apoptosis [8], and MakA, a bacterial cytotoxin from *Vibrio cholerae* that selectively kills colorectal cancer cells by destabilizing lysosomes and suppressing the β-catenin signaling pathway [9]. We assume that the combined delivery of azurin with such pro-apoptotic factors will enhance the death of tumor cells by simultaneously affecting various mechanisms of apoptosis.

Local delivery of azurin using *E. coli* Nissle 1917 will allow targeted destruction of tumor cells in the intestine with minimal systemic side effects. Overall, our approach may open new avenues for developing safe and effective biotherapeutic strategies for the treatment of CRC.

References

1. Tang H. et al. Tumor-targeting engineered probiotic *E. coli* Nissle 1917 inhibits colorectal tumorigenesis and modulates gut microbiota homeostasis in mice // Life Sciences. 2023. Vol. 321. P. 121709.

2. Leader B., Baca Q. J., Golan D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification // Nature Reviews Drug Discovery. 2008. Vol. 7. P. 21–39.

© N. Deeb, G. D. Otinov, E. Mouhammad, E. I. Koshel, 2025

3. Masloh S. et al. Challenges and opportunities in the oral delivery of recombinant biologics // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15. P. 1415.

4. He L. et al. *E. coli* Nissle 1917 as a targeted vehicle for delivery of p53 and Tum-5 to solid tumors // Journal of Biological Engineering. 2019. Vol. 13. P. 58.

5. Gronbach K. et al. Safety of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 depends on intestinal microbiota and adaptive immunity of the host // Infection and Immunity. 2010. Vol. 78. P. 5239–5249.

6. Ma Y. et al. Efficient cytotoxicity of recombinant azurin in *Escherichia coli* Nissle 1917-derived minicells against colon cancer cells // Bioengineering. 2023. Vol. 10. P. 1188.

7. Hu J. et al. Structural basis of bacterial effector protein azurin targeting tumor suppressor p53 and inhibiting its ubiquitination // Communications Biology. 2023. Vol. 6. P. 59.

8. Li M. The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases // Apoptosis. 2021. Vol. 26. P. 235–247.

9. Toh E. et al. Bacterial protein MakA causes suppression of tumour cell proliferation via inhibition of PIP5K1α/Akt signalling // Cell Death & Disease. 2022. Vol. 13. P. 1024.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-40

ASPERGILLUS FUNGI ARE A SOURCE OF BIS-INDOLE ALKALOIDS WITH ANTICANCER ACTIVITY*

O. O. Khmel[1,2], A. D. Savagina[1], E. A. Chingizova[1], E. M. Zhidkova[3], E. A. Yurchenko[1]

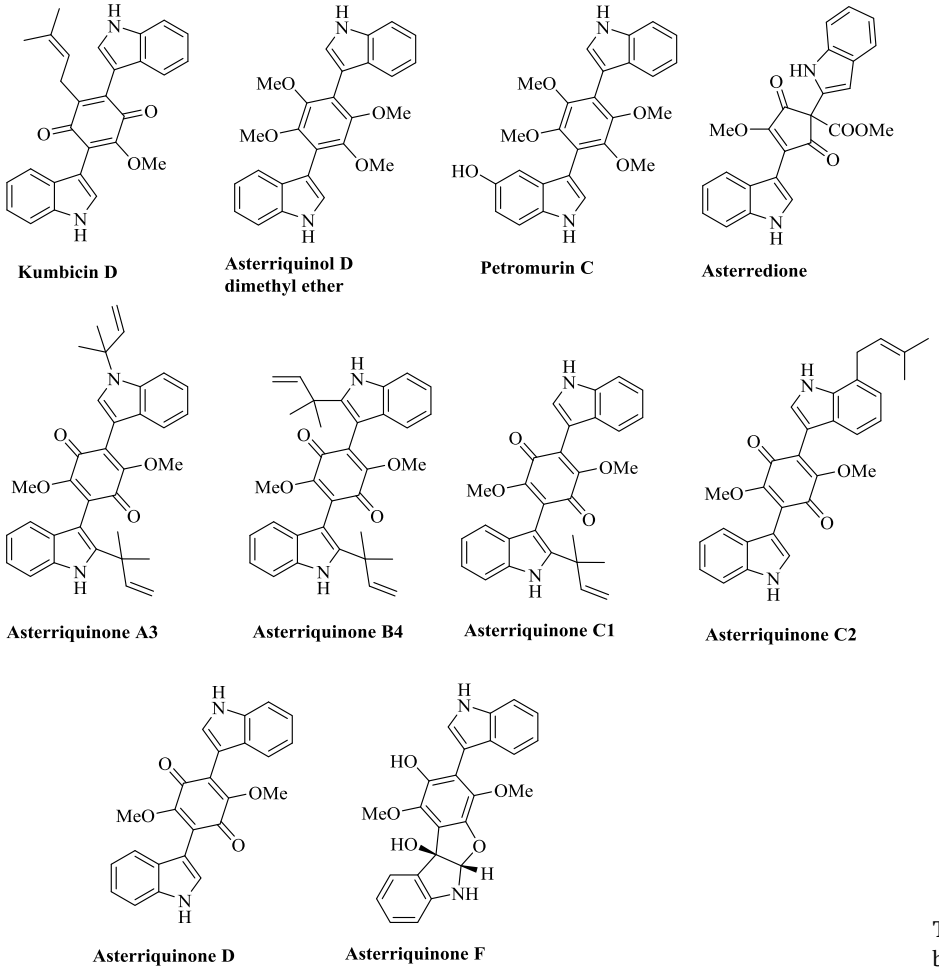
[1] *G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok*
[2] *Far Eastern Federal University, Vladivostok*
[3] *N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow*

✉ khmel.oo@dvfu.ru

Abstract

Marine-derived *Aspergillus* strains produce bis-indole alkaloids, some of which (petromurin C, asterriquinones B4 and C1) exhibit selective cytotoxicity against MCF-7 breast cancer cells in monolayer and 3D, inhibiting proliferation via the ER-dependent pathway. The biotechnological potential of these strains was confirmed by the high yield of compounds, reaching 2.7 mg/g in the fungal extract.

Bis-indole alkaloids are structurally complex natural compounds with two indole groups moieties attached to pyrrole, piperazine, quinone, and other moieties which provide various bioactivities. For example, staurosporine and its derivatives exhibit potent antiproliferative activity [1]. A total of 425 microorganism-derived bis-indole alkaloids have been reported between 1962 and 2023 [2]. Bacteria are the source of bis-indole pyrroles and dixiamycins, while indole piperazines and asterriquinones have been isolated from various fungi, mainly from the *Aspergillus* genus, including marine isolates [3].



The structures of investigated bis-indole alkaloids

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #25-73-20049).

© O. O. Khmel, A. D. Savagina, E. A. Chingizova, E. M. Zhidkova, E. A. Yurchenko, 2025

The aim of the present study was to investigate the cytotoxic and anticancer activities of several bis-indole alkaloids isolated from marine-derived *Aspergillus subramanianii* 1901NT-1.40.2 and *A. terreus* KMM 5900 strains. Kumbicin D, asterriquinol D dimethyl ether, petromurin C, and asterredione were isolated from Vietnamese strain *A. subramanianii* 1901NT-1.40.2. Asterriquinones A3, B4, C1, C2, D, and F were obtained from a Vietnamese isolate of *A. terreus* [4].

The cytotoxic activities of all compounds on breast cancer MCF-7 and normal H9c2 and MCF-10A cells were investigated.

Petromurin C and asterriquinones B4 and C1 ($\leqslant$ 10 μM) significantly decreased MCF-7 cell viability and inhibited colony formation, proliferation, and migration in monolayer culture. They exhibited specific cytotoxicity against breast cancer MCF-7 cells compared to normal cells. Petromurin C significantly decreased the area of MCF-7 spheroids in 3D culture by approximately 30 %. Competitive test with 4-hydroxytamoxifen and molecular docking showed that estrogen receptors (ERβ more than ERα) have been involved in the anticancer effect of petromurin C. RT-PCR assay confirmed that petromurin C affects the transcriptional activity of ER-dependent *CCNG2*, *REA*, *GREB1*, and *IGFBP4* genes, resulting in cell cycle disturbance.

Approaches to the synthesis of prenylated asterriquinones have been developed [5], but they have encountered a number of difficulties, and attempts to develop a synthesis, for example, of petromurin C, continue [6]. In this regard, the biotechnological method of obtaining these compounds from fungal cultures is relevant. In our investigation, the marine stain *A. subramanianii* 1901NT-1.40.2 produced petromurin C with a yield of 2.7 mg/g of crude EtOAc dried extract. The yields of asterriquinones B4 and C1 from *A. terreus* KMM 5900 culture were 1.0 mg/g and 0.9 mg/g of crude EtOAc dried extract, respectively.

Thus, the Vietnamese marine fungal strains *A. subramanianii* 1901NT-1.40.2 and *A. terreus* KMM 5900 are a source of bis-indole benzoquinone alkaloids with significant activity against estrogen-dependent breast cancer MCF-7 cells.

References

1. Gupta L., Talwar A., Chauhan P. M. S. Bis and Tris Indole Alkaloids from Marine Organisms: New Leads for Drug Discovery // Frontiers in Medicinal Chemistry. 2012. Vol. 6.

2. Zhang Z.-L., Xu H.-N., Gong C.-M. et al. Microorganism-Derived Bisindole Alkaloids With Anticancer Potential and Their Mechanisms: A Comprehensive Review // Chemistry & Biodiversity. 2025. Vol. 22, No. 5.

3. Wibowo J. T., Ahmadi P., Rahmawati S. I. et al. Marine-Derived Indole Alkaloids and Their Biological and Pharmacological Activities // Marine Drugs. 2022. Vol. 20, No. 1.

4. Girich E. V., Yurchenko A. N., Smetanina O. F. et al. Neuroprotective Metabolites from Vietnamese Marine Derived Fungi of Aspergillus and Penicillium Genera // Marine Drugs. 2020. Vol. 18, No. 12.

5. Lindel T., Marsch N., Adla S. K. Indole Prenylation in Alkaloid Synthesis // Alkaloid Synthesis / H.-J. Knölker. Berlin, Heidelberg. 2012. P. 67–129.

6. Zi-Hao Jia, Qing-Chun Song, Pei-Hua Zhao et al. Organocatalytic Substrate-Controlled Regioselective Reactions of 2-Indolylmethanols with Phenols And Alcohols Access 3-Aryl Indoles and Indole-Derived Triaryl Ethers // 2025.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-41

METHODOLOGICAL APPROACHES TO BACTERIAL CELLULOSE CULTIVATION IN THE PROTOTYPE DEVELOPMENT OF ROTATING DISK BIOREACTOR *

O. I. Kuchugurin[1], V. Gupta[1], E. A. Knyazkova[1], E. I. Mikheeva[2]

[1] *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*
[2] *byScoby LLC, Saint Petersburg*

✉ ei.mikheeva@yandex.ru

Abstract

The cultivation methods of widely studied bacterial cellulose are mainly based on stationary cultivation methods. Modern approaches also aim to improve technical equipment for controlled agitated systems and implement scaling up for production. This article covers methodological principles for bacterial cellulose cultivation in the development of rotating disk bioreactors.

The studies on the cultivation of biomaterials, in particular bacterial cellulose, are promising for the development of a technological process and its optimization to obtain a high yield [1, 2]. Advanced strategies for bacterial cellulose cultivation require not only optimization and modification of potential strains but also improvement of technical equipment and implementation to further expand [3]. This study examines methodological approaches related to biotechnological parameters of bacterial cellulose cultivation and the conceptual development of a novel bioreactor using round disks to increase yield during dynamic cultivation.

To develop a prototype with demonstration functions, traditional methods and parameters of the bacterial cellulose cultivation, including temperature, pO2, pH of the medium and cultivation time, were considered. As a result, a cylindrical bioreactor prototype was developed based on the conceptual model. The prototype consisted of 12 rotating disks with holes for aeration, which were mounted on a shaft. The disks were adapted for fed-batch mode cultivation of bacterial cellulose biofilms. The bioreactor was equipped with pH, temperature and water level sensors, and was initially tested for construction integrity against leakage and speed of rotation with increasing disk weight at byScoby LLC facilities. Notably, the cylindrical design avoided turbulent flows over the housing, minimizing foaming.

The planned further prototype modification is considered to implement the entire 10-day cycle of bacterial cellulose cultivation and confirm the hypothesis of an increase in product yield by at least 10 times, which is the next step in the scaling up production strategy.

References

1. Andriani D., Apriyana A. Y., Karina M. The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review // Cellulose. 2020. Vol. 27. P. 6747–6766.

2. Girard V. D., Chaussé J., Vermette P. Bacterial cellulose: A comprehensive review // J. Appl. Polym. Sci. 2024. Vol. 141, No. e55163.

3. Parte F. G., Santoso S. P., Chou C. C. et al. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose // Critical Reviews in Biotechnology. 2020. Vol. 40, No. 3. P. 397–414.

* The study is supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (grant #1379ГССС15-L87988 from 01.09.2023).

© O. I. Kuchugurin, V. Gupta, E. A. Knyazkova, E. I. Mikheeva, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-42

OVEREXPRESSION OF MTDNA REPAIR GENE — *MUTYH* — USING CRISPRA TO ENHANCE RESISTANCE TO GENOTOXIC AND OXIDATIVE STRESS

R. Mhanna[1], I. O. Velegzhaninov[2]

[1]*SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*
[2]*Institute of Biology, Komi Science Centre UB RAS, Syktyvkar*

✉ iamramimhanna@gmail.com

Abstract

Mitochondria is mostly susceptible to oxidative DNA damage mainly because of proximal ROS production, lesioning mtDNA and resulting in mitochondrial dysfunction and follow up cellular machinery failure. This work discusses the possibility of increasing mtDNA repair by inducing overexpression of mtDNA repair gene — *MUTYH* — using controlled CRISPRa technique.

Mitochondrial DNA is vulnerable to oxidative and genotoxic stress due to its proximity to reactive oxygen species (ROS) mainly generated by the electron transport chain, lack of protective histones, and limited DNA repair capacity, unlike nuclear DNA. Accumulating damage in the mitochondrial genome highly contributes to mitochondrial dysfunction, cellular energy failure, and pathogenesis [1].

MUTYH gene product — Adenine DNA glycosylase — detects and excises adenine opposite mispaired 8-oxoG (a common ROS-induced lesion), initiating BER to prevent G:C → T:A transversions, and after adenine removal, downstream BER enzymes (*OGG1*, *APE1*, *POLβ*, *LIG1/LIG3*, *PARP1*, *XRCC1*) restore the correct G:C pair. *MUTYH* has two splicing variants — nuclear & mitochondrial. Their fundamental difference is the presence or absence of the first exon, which encodes the mitochondrial localization signal (MLS) [2, 3].

There is evidence suggesting *MUTYH* influences apoptosis signaling if overexpressed, where it is believed that persistent lesions or repair intermediates (AP sites, single-strand breaks) can trigger cell death. Therefore, studies show contradicting results about the direct action of this gene. Survival or death? [4–6].

In this project, we investigate whether overexpressing a key mitochondrial DNA repair gene — *MUTYH* — via CRISPR activation (CRISPRa) system enhances cellular resistance to ionizing radiation and chemical oxidation and mitigates radiation-induced mitochondrial dysfunction. Although MUTYH gene knockdown/knockout or overexpression experiments were conducted before [7–9], there was no mention of using CRISPRa constructs to overexpress this particular gene in literature to our knowledge, therefore, this work will be performed for the first time in HEK293T and HeLa cell lines.

We designed sgRNAs targeting three distinct locations upstream of the transcription start site (−80, −165, −255 nt) to selectively guide dCas9-VPH protein complex towards mitochondrial variant of MUTYH. We aim to assess the grade of overexpression using our designs (singularly and in combinations) and the protective role of controlled elevated expression of *MUTYH* gene on the overall mitochondrial genome stability against chemical and radiation-induced damage. Outcomes will be evaluated through assays measuring mtDNA integrity and mitochondrial function, and cellular viability.

This work may provide insights into mtDNA repair genes and controlled mechanisms of action and novel strategies for enhancing mitochondrial resilience and improving therapeutic responses in oxidative stress-associated conditions.

References

1. Richter C. et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Basis of Disease. 1995. Vol. 1271, No. 1. P. 67–74.

2. Out A. A. et al. Leiden Open Variation Database of the MUTYH gene // Human Mutation. 2010. Vol. 31, No. 11. P. 1205–1215.

3. Arai T. et al. Up-regulation of hMUTYH, a DNA repair enzyme, in the mitochondria of substantia nigra in Parkinson's disease // Acta Neuropathologica. 2006. Vol. 112, No. 2. P. 139–145.

4. Oka S., Nakabeppu Y. DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis // Cancer Science. 2011. Vol. 102, No. 4. P. 677–682.

5. Oka S. et al. MUTYH, an adenine DNA glycosylase, mediates p53 tumor suppression via PARP-dependent cell death // Oncogenesis. 2014. Vol. 3, No. 10. P. e121.

6. Raetz A. G. et al. The DNA repair enzyme MUTYH potentiates cytotoxicity of the alkylating agent MNNG by interacting with abasic sites // Journal of Biological Chemistry. 2020. Vol. 295, No. 11. P. 3692–3707.

© R. Mhanna, I. O. Velegzhaninov, 2025

7. Hwang B.-J., Shi G., Lu A.-L. Mammalian MutY homolog (MYH or MUTYH) protects cells from oxidative DNA damage // DNA Repair. 2014. Vol. 13. P. 10–21.

8. Kremer T. M. et al. Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase // Respiratory Research. 2004. Vol. 5, No. 1. P. 16.

9. Gupta A. et al. Mammalian MutY Homolog (MYH or MUTYH) is critical for telomere integrity under oxidative stress // OBM Geriatrics. 2022. Vol. 6, No. 2. P. 196.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-43

ENZYMATIC ACTIVITY OF THE FUSION PROTEIN OF TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE WITH DNA-BINDING PROTEIN SSO7D FROM *S. SOLFATARICUS* *

A. B. Sachanka, P. A. Kulesh, V. V. Shchur, A. V. Yantsevich

Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk

✉ antosuk@yandex.ru

Abstract

Gene fusion techniques have demonstrated promising results in developing more active, processive DNA polymerases. In the present work, we isolated and investigated the activity of a fusion enzyme combining terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) with the DNA-binding protein from *Sulfolobus solfataricus* (Sso7d). The fusion proteins exhibit enhanced 3′-5′ exonuclease activity, which substantially impairs their nucleotide incorporation efficiency.

Motivation and aim

The TdT is a unique polymerase that incorporates nucleotides at the 3′-terminus of single-stranded DNA primers in a template-independent manner. This biological function has propelled the development of numerous biomedical and bioengineering applications [1]. The extensive utilization of TdT is constrained by its low expression levels in *E. coli*, low optimal operating temperature, and difficulty in controlling its enzymatic activity [2]. To address these limitations, we designed and isolated a fusion enzyme combining TdT and the Sso7d. Sso7d exhibits nonspecific binding activity toward dsDNA and RNA sequences, distorts the structure of duplex DNA, and has previously been successfully employed as a fusion domain for developing improved molecular biology tools [3]. We expect that the obtained fusion enzymes could serve as prospective candidates for novel, specific applications.

Methods

The fusion genes were obtained by overlap extension PCR and cloned into the pCWori (TdT_Sso7d) and pET20b (Sso7d_TdT) vectors. All proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, which were cultivated in TB media and purified by immobilized metal affinity chromatography. Enzymatic activity was quantified by measuring the reaction products, which were separated using a C18 column under standard ion-pair reverse-phase chromatography conditions and detected at 260 nm.

Results

The Sso7d on C-terminus of the TdT showed a complete loss of catalytic activity in the addition of nucleotides and more pronounced 3′-5′ exonuclease activity in the deletion of nucleotides from the coding end. In contrast, the Sso7d_TdT demonstrated less nucleotide addition activity (0.14 U/μM for Sso7d_L3_TdT and 0.18 U/μM for Sso7d_L2_TdT) than native TdT (0.27 U/μM) and exhibited a pronounced deletion of nucleotides from the coding end.

The presence of Co^{2+} and Mn^{2+} ions in the reaction mixture with Sso7d_L2_TdT leads to fewer nucleotide deletions, increased processivity, and enhanced nucleotide-addition activity, correlating with stronger binding to the substrate and nucleotide in the enzyme's active site due to these metal ions [4]. Incorporation of Ca^{2+} into the assay buffer produced a near-complete loss of TdT's catalytic activities. Zn^{2+} ions decrease nucleotide-addition activity and, to a greater extent, nucleotide-deletion activity. Moreover, Zn^{2+} binding to nucleobases shifts the enzyme from a processive to a distributive mode by disrupting dNTP interactions within the active site [4].

The nucleotide incorporation and processivity of Sso7d_L2_TdT increased with the extension of the oligonucleotide sequence, similar to TdT, but only up to the T_{25} substrate, for which the activity was significantly reduced. Further substrate elongation led to a significant decrease in activity, which could be related to enhanced binding with the Sso7d domain. The use of a substrate containing secondary structure significantly reduces the activity and processivity of the native TdT, restricting it to a single product. This effect is even more pronounced with Sso7d_L2_TdT, which exhibits increased affinity for dsDNA.

Conclusion

The significant loss of nucleotide addition activity and enhanced nucleotide deletion activity render the obtained fusion proteins unsuitable for *de novo* DNA synthesis or translational applications. The increased nucleotide deletion

* The study is supported by the National Academy of Sciences of Belarus (project #2023-27-021).

© A. B. Sachanka, P. A. Kulesh, V. V. Shchur, A. V. Yantsevich, 2025

activity, combined with the addition activity, which can be controlled by the presence of metal ions, may be advantageous for specific applications such as aptamers engineering, mutagenesis studies, or gene editing.

References

1. Motea E. A., Berdis A. J. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase // Biochimica et Biophysica Acta — Proteins & Proteomics. 2010. Vol. 1804, No. 5. P. 1151–1166.

2. Kuan W. L., Joy J., Mee N. F. et al. Generation of active bovine terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in E. coli // Biochemistry Insights. 2010. Vol. 3. URL: https://journals.sagepub.com/doi/10.4137/BCI.S5123 (дата обращения: 28.06.2025).

3. Wang Y., Prosen D. E., Mei L. et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32. P. 1197–1207.

4. Kuznetsova A. A., Tyugashev T. E., Alekseeva I. V. et al. Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase // Life Science Alliance. 2022. Vol. 5, No. 12. URL: https://www.life-science-alliance.org/content/5/12/e202201428 (дата обращения: 28.06.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-44

ENGINEERING A NEAR-INFRARED LIGHT-INDUCIBLE GENE EXPRESSION SYSTEM FOR PLANTS USING BPHP1-QPAS1 AND LOV DOMAINS *

E. S. Surkova[1,2], Y. A. Galimova[1], N. V. Battulina[1], D. M. Motorina[1], E. S. Omelina[1]

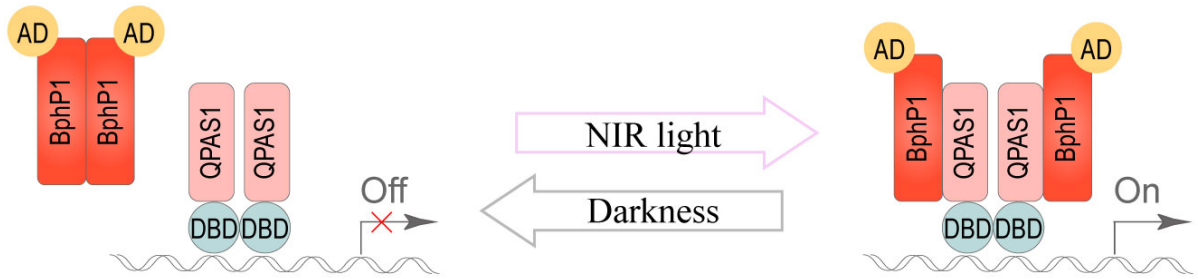
[1]*Institute of Molecular and Cell Biology SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Novosibirsk State University*

✉ ellina.sur@gmail.com

Abstract

The application of optogenetics in plants is limited by their requirement for white-light cultivation, which causes nonspecific activation of light-sensitive proteins [1]. Our proposed solution combines the existing bacterial BphP1-QPAS1 system with additional light-sensitive components and signal peptides to overcome these limitations.

The BphP1-QPAS1 system operates through interaction between the bacterial phytochrome BphP1 and its truncated partner QPAS1 [2]. Heterodimer formation under near-infrared (NIR) light (780 nm) brings together DNA-binding (DBD) and activation (AD) domains, triggering target gene expression (see figure). Although first validated in mammalian cells, the BphP1-QPAS1 system is particularly suitable for plants as its activation wavelength avoids interference with endogenous photoreceptor pathways [3].



A schematic representation of the BphP1-QPAS1 activation

To prevent undesired white-light-induced activity, we fused QPAS1 to the blue-light-sensitive (460–480 nm) LOV domain protein *As*LOV2 [4, 5] and incorporated either nuclear export signals or the RRRG degron.

All constructs were evaluated in *Nicotiana benthamiana* leaves via agroinfiltration, with pEGFP reporter expression assessed by fluorescence microscopy. The desired optogenetic profile, strong pEGFP induction under NIR light with no detectable activation under white light or darkness, was achieved with the *As*LOV2-RRRG degron variant. Functionally, white-light exposure triggered unfolding of the *As*LOV2 C-terminal Jα helix, exposing the fused RRRG degron and subsequently targeting the chimeric protein for degradation. In contrast, NIR illumination maintained the degron in its buried conformation, permitting unimpeded system activation and robust pEGFP expression. This demonstrates that light-inducible degradation is more effective than nuclear export for preventing leakage. While currently validated in *N. benthamiana*, our BphP1-QPAS1/*As*LOV2-RRRG degron system holds promise for both agricultural and fundamental applications. In crop engineering, this light-controlled platform could enable chemical-free regulation of stress resistance or yield-related traits through targeted gene expression. For plant research, integrating optogenetics with CRISPR/Cas9 may allow precise spatiotemporal control of gene editing, facilitating functional studies in specific tissues or developmental stages. Further optimization could expand this technology to staple crops and field conditions, supporting sustainable agriculture with reduced environmental impact.

References

1. Braguy J., Zurbriggen M. D. Synthetic strategies for plant signalling studies: molecular toolbox and orthogonal platforms // The Plant Journal. 2016. Vol. 87, Iss. 1. P. 118–138.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #22-74-10118-П).

© E. S. Surkova, Y. A. Galimova, N. V. Battulina, D. M. Motorina, E. S. Omelina, 2025

2. Redchuk T.A. et al. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing // Nature Chemical Biology. 2017. Vol. 13, Iss. 6. P. 633–639.

3. Johnson M.P. Correction: Photosynthesis // Essays in Biochemistry. 2017. Vol. 61, Iss. 4. P. 429.

4. Kaya S.G., Hovan A., Fraaije M.W. Engineering of LOV-domains for their use as protein tags // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2025. Vol. 763. P. 110228.

5. Kim C. et al. Structural dynamics of protein-protein association involved in the light-induced transition of Avena sativa LOV2 protein // Nature Communications. 2024. Vol. 15, Iss. 1. P. 6991.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-45

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПОЛИАМИДОВ *

THE APPLICATION OF *ESCHERICHIA COLI* FOR THE SYNTHESIS OF COMPONENTS FOR THE PRODUCTION OF BIOPOLYAMIDES

В. А. Абрамова[1,2], А. В. Ахова[1,2], А. Г. Ткаченко[1]

[1] *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь*
[2] *Пермский национальный исследовательский политехнический университет*

V. A. Abramova[1,2], A. V. Akhova[1,2], A. G. Tkachenko[1]

[1] *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm*
[2] *Perm National Research Polytechnic University*

✉ valyusha_abramova@mail.ru

Аннотация

Исследована способность 138 природных изолятов *Escherichia coli* синтезировать полиамины на питательных средах различного состава. Наибольший выход полиаминов наблюдался на средах с добавкой аминокислоты-предшественника. Выявлены культуры, способные продуцировать до 0,3 М 1,5-диаминопентана, и подобраны оптимальные условия их культивирования.

Abstract

The ability of 138 natural *Escherichia coli* isolates to synthesize polyamines on nutrient media of various compositions has been studied. The highest yield of polyamines was observed on media with the addition of the precursor amino acids. Bacteria capable of producing up to 0.3M 1,5-diaminopentane were found and optimal conditions for their cultivation were determined.

В настоящее время доля полимеров на основе биологического сырья (биопластиков) в общем объеме производства пластмасс неуклонно растет [1]. Одним из востребованных классов соединений являются полиамиды [2]. Компонентами для синтеза полиамидов являются полиамины, часть из которых может быть получена в процессах биосинтеза из возобновляемых ресурсов. В частности, бактерии способны синтезировать пользующиеся спросом полиамины — путресцин и кадаверин, за счет декарбоксилирования аминокислот [3].

Цель работы — поиск продуцентов полиаминов среди природных изолятов *Escherichia coli* и оценка возможности их применения в качестве биокатализаторов.

В качестве объектов исследования использовано 138 природных изолятов *E. coli* из коллекции лаборатории молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН и штамм *E. coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Для изучения способности синтезировать полиамины микроорганизмы культивировали на средах различного состава в течение 24 ч, после чего проводили количественный анализ полиаминов [4]. В работе использовано пять типов сред: минимальная среда M9 с добавлением 0,4%-й глюкозы, среда M9 с добавлением 0,4%-й глюкозы и 10 г/л аминокислоты-предшественника (гидрохлоридов лизина, орнитина или аргинина), бульон LB. При культивировании на среде, содержащей единственный источник углерода и энергии, максимальные концентрации путресцина достигали 0,3–0,4 мМ, кадаверина — 0,5–0,6 мМ и спермидина — 20–100 мкМ. Наибольшие концентрации полиаминов были получены на средах, содержащих аминокислоту-предшественник: максимальные концентрации кадаверина получены на среде с добавкой лизина (6–6,5 мМ), путресцина — на среде с добавкой аргинина (2–5 мМ).

В качестве основы для разработки биокатализатора выбраны изоляты *E. coli* N16 и N82. При использовании в качестве биокатализатора *E. coli* N16 максимальная концентрация кадаверина (0,3 М) достигалась при концентрации лизина 150 г/л, $ОП_{600}$ = 10 и культивировании в течении 24 ч. При более низких концентрациях лизина (1 и 50 г/л) продукция кадаверина культурой с оптической плотностью $ОП_{600}$ = 10 не превышала 20 мМ. В слу-

* Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда и Правительства Пермского края (проект № 25-24-20140).

© В. А. Абрамова, А. В. Ахова, А. Г. Ткаченко, 2025

чае природного изолята N82 максимальный выход кадаверина (55 мМ) наблюдался в тех же условиях, но уже на 4-й час культивирования, что может свидетельствовать о высокой скорости биоконверсии.

Литература

1. Skoczinski P., Carus M., Tweddle G. et al. Bio-based building blocks and polymers — global capacities, production and trends 2023–2028. Hürth: nova-Institut GmbH, 2024. P. 56.

2. Карсакова Е. В., Кравченко Т. П. Свойства и области применения полиамидов различных типов // Успехи в химии и химической технологии. 2008. Т. 22 (5). С. 10–13.

3. Anthony J. Michael. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea // Journal of Biological Chemistry. 2016. Vol. 291. P. 14896–14903.

4. Ахова А. В., Ткаченко А. Г. Роль биосинтеза кадаверина в адаптации Escherichia coli к действию пероксида водорода // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58 (5). С. 467–475.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-46

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДНЫХ РОСТСТИМУЛЯТОРОВ И ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ РАСТЕНИЙ *

BIOTECHNOLOGY FOR PRODUCING PEPTIDE GROWTH STIMULATORS AND IMMUNOMODULATORS FOR PLANTS

В. С. Агеева[1,2], Е. А. Рогожин[1–3]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин*
[3] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

V. S. Ageeva[1,2], E. A. Rogozhin[1–3]

[1] *Lomonosov Moscow State University, Moscow*
[2] *All-Russian Institute of Plant Protection, Saint Petersburg, Pushkin*
[3] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ victorias.ageeva@gmail.com

Аннотация

Пептидные гормоны растений играют ключевую роль в регуляции роста и иммунного ответа. В работе проведен биоинформатический анализ и определена консенсусная последовательность регуляторных пептидов семейства RALF для порядка капустоцветные (*Brassicales*). Осуществлен синтез рекомбинантного пептида RALF путем гетерологической экспрессии в системе *E. coli*. Результаты открывают перспективы для создания новых препаратов для защиты растений.

Abstract

Plant peptide hormones play a key role in regulating growth and immune responses. In this work, we performed a bioinformatic analysis and determined the consensus sequence of RALF family peptides for the order *Brassicales*. A recombinant RALF peptide was synthesized via heterologous expression in an *E. coli* system. The results open up prospects for the creation of new plant protection products.

Ключевой задачей современных агробиотехнологий является создание высокоэффективных и экологически безопасных препаратов, способных стимулировать рост и повышать иммунитет растений. Пептидные регуляторы (гормоны) представляют собой идеальную основу для таких препаратов благодаря их высокой специфичности и активности для растительной клетки [1]. Однако их прямое выделение из природных источников нерентабельно. В связи с этим разработка биотехнологических методов получения пептидных ростстимуляторов и иммуномодуляторов является крайне актуальным направлением биоэкономики.

В данной работе в лабораторных условиях был реализован полный биотехнологический цикл: от биоинформатического дизайна целевой молекулы до ее получения в гетерологичной системе. В качестве основного объекта был выбран пептид семейства RALF (Rapid Alkalinization Factor), известный своим участием в регуляции роста и стрессовых реакций [2, 3]. С помощью биоинформатического анализа была определена консенсусная последовательность пептида RALF для таксономического порядка *Brassicales*, объединяющего множество сельскохозяйственных культур. Предсказание вторичной структуры выявило преобладание α-спиралей, что является благоприятным фактором для стабильного фолдинга и успешного биотехнологического производства. Кроме того, было проведено предсказание третичной структуры с использованием биоинформатических методов, таких как AlphaFold2, которое указало на возможный тип укладки — цистеин-стабилизированный α/β мотив. Этот тип укладки, характерный для цистеин-богатых пептидов, известен своей высокой устойчивостью к разнообразным физико-химическим факторам, что является крайне важным для дальнейшего практического применения полученного пептида.

Центральным этапом работы стало создание бактериального штамма-продуцента рекомбинантного пептида. Ген, кодирующий консенсусную последовательность пептида RALF, был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Сравнение различных экспрессионных штаммов (*SHuffle* и *BL21*) позволило оптимизировать протокол получения, выявив, что штамм *BL21* обеспечивает наивысшую чистоту продукта. Таким образом, была

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-76-30005-П).
© В. С. Агеева, Е. А. Рогожин, 2025

создана и апробирована биотехнологическая платформа для наработки растительного пептидного регулятора в микроорганизмах, что является ключевым шагом на пути к его практическому применению.

Проведенное исследование демонстрирует успешное применение методов генной инженерии и биоинформатики для разработки пептидных биопрепаратов. Созданная система получения рекомбинантного пептида RALF закладывает основу для дальнейшего изучения его агрономического потенциала в качестве ростстимулятора и иммуномодулятора нового поколения.

Литература

1. Ганчева М. С., Маловичко Ю. В., Полюшкевич Л. О. и др. Пептидные гормоны растений // Физиология растений. 2019. Т. 66. С. 83–103.

2. Murphy E., De Smet I. Understanding the RALF family: a tale of many species // Trends in Plant Science. 2014. Vol. 19 (10). P. 664–671.

3. Lu R. et al. From Roots to Reproduction: The Multifaceted Roles of RALF and EPF Peptides in Plants // Journal of Experimental Botany. 2024. Vol. 93 (12). P. 3465–3485.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-47

БИОКОМПОЗИТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

BACTERIAL CELLULOSE BIOCOMPOSITE FOR 3D-CULTIVATION OF TUMOR CELLS

А. Ю. Алексеева, А. Н. Шишпарёнок, Д. Д. Жданов

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

A. Y. Alekseeva, A. N. Shishparenok, D. D. Zhdanov

V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

✉ annaalekseeva2345@gmail.com

Аннотация

Двумерное культивирование (2D) часто используется для моделирования опухолевых процессов из-за простоты, однако имеет ряд недостатков, таких как измененная морфология и поведение клеток, а также низкая прогнозируемость ответа на лекарства. В данной работе разработан композит на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) для трехмерного культивирования (3D) клеток рака легкого и проведено сравнение действия цисплатина на 2D- и 3D-культуры.

Abstract

Two-dimensional (2D) cultivation is often used to model tumor processes due to its simplicity, but it has several disadvantages, such as altered cell morphology and behavior, as well as low predictability of drug response. In this work, a composite based on bacterial cellulose (BC) was developed for the three-dimensional cultivation (3D) of lung cancer cells and the effect of cisplatin on 2D and 3D cultures was compared.

Введение

Для моделирования действия противоопухолевых препаратов на раковые клетки чаще всего используют 2D-культуры, однако морфология и рост клеток в 3D-культуре ближе к условиям *in vivo*, чем при 2D-культивировании [1]. 2D-культивирование также не может имитировать гетерогенность опухоли, в то время как рост опухоли в 3D-среде позволяет находиться клеткам в постоянном контакте с внеклеточным матриксом и другими клетками [2].

Матригель наиболее часто используется для 3D-культивирования, однако, помимо труднодоступности, его химический состав непостоянен. В связи с этим разрабатываются иные матрицы для 3D-культивирования из более доступных материалов и с лучшей стабильностью [3].

БЦ является одним из перспективных материалов для создания матриц для 3D-культивирования благодаря хорошей биосовместимости, чистоте, отсутствию иммуногенности, а также простоте производства и модификации [4].

Материалы и методы

В качестве продуцента БЦ использовали штамм *Komagataeibacter hansenii* (ВКПМ № В-11239). Для наработки биомассы продуцента штамм культивировали статично на модифицированной среде Хестрина — Шрамма в течение 10 суток. Для получения пленок БЦ к полученной биомассе продуцента добавляли среду и переносили в чашки Петри, где выращивали в течение 7 суток до образования пленок. Очищенные пленки измельчали гомогенизатором в течение 20 минут при скорости 20 000 об/мин и фильтровали через сито с размером ячеек 75 мкм.

Для приготовления композита использовали полученный концентрированный фильтрат БЦ, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000 Да, поливиниловый спирт (ПВС) и 70%-й этанол, которые прогревали при 80 °С в течение 3 часов. Полученный гель вносили по 500 мкл в 24-луночный планшет и замораживали при температуре −24 °С. Через 24 часа композит размораживали при комнатной температуре и замораживали повторно для образования высокопористой структуры за счет формирования кристаллов льда внутри матрицы.

Для характеристики физических свойств биокомпозита определяли водоудерживающую способность, адсорбционную емкость и пористость, а также динамику его набухания. Для определения химического состава композита использовали инфракрасную спектроскопию. Для работы использовали клетки H1299-GFP, конститу-

© А. Ю. Алексеева, А. Н. Шишпарёнок, Д. Д. Жданов, 2025

тивно экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок. Для определения оптимальной концентрации клеток для посадки в 2D-культуру и гелевый 3D-композит, а также с целью определения значений IC50 для действия цисплатина на клетки проводили МТТ-тест.

Перед посадкой клеток композиты предварительно инкубировали при 37 °С в стерильном фосфатно-солевом буфере в течение 12 часов и промывали фосфатно-солевым буфером для удаления спирта. После этого гель прогревали на термостате при 77 °С в течение 10 минут. Клетки H1299-GFP ($1{,}8 \times 10^5$ клеток/лунку) высаживали на поверхность гелевого композита и растили на среде DMEM. Каждые 72 часа 50 % среды заменяли на свежую. Фотографии клеток в биокомпозите получали в течение 15 дней на флуоресцентном микроскопе МИБ-2-ФЛ.

Результаты

Разработан композит, содержащий БЦ, ПВС и ПЭГ (6 %). Состав геля был подтвержден с помощью ИК-спектроскопии. Во влажном состоянии его средняя масса составила 0,527 г, в лиофилизированном — 0,206 г, а при повторном замачивании — 1,003 г. Данные результаты указывают на то, что 3D-композит также обладает высокой способностью к набуханию, характерной для гидрогелей.

Определены водопоглощающая способность композита — 62,2 %, адсорбционная способность — 389,4 % и пористость — 677,1 %. Полученные данные указывают на то, что добавление ПВС и ПЭГ к концентрату БЦ изменяют ее физико-химические свойства, переводя структуру в гидрогелевую. В лиофилизированном виде БЦ сама по себе не обладает высокой пористостью и способностью к набуханию.

При оценке жизнеспособности клеток после добавления цисплатина в 2D-модель и полученный 3D-композит выявили следующие различия: цисплатин был эффективен в отношении 2D-культуры H1299-GFP, в то время как на 3D-культуру цисплатин не оказывал заметного токсического влияния. Таким образом, действие цисплатина на 2D- и 3D-культуру различалось.

Во время культивирования морфология клеток H1299-GFP не изменялась, и композит не был подвержен деградации. Это указывает на то, что разработанный композит подходит для длительного культивирования без токсического действия на клетки.

Литература

1. Karki S. B., Thapa Gupta T., Yildirimayan E. et al. Investigation of non-thermal plasma effects on lung cancer cells within 3D collagen matrices // Journal of Physics D: Applied Physics. 2017. Vol. 50.

2. Moghimi N., Hosseini S. A., Dalan A. B. et al. Controlled tumor heterogeneity in a co-culture system by 3D bio-printed tumor-on-chip model // Sci. Rep. 2013. Vol. 13. Art. 13648.

3. Caliari S. R., Burdick J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture // Nat. Methods. 2016. Vol. 13. P. 405–414.

4. Halib N., Ahmad I., Grassi M., Grassi G. The remarkable three-dimensional network structure of bacterial cellulose for tissue engineering applications // Int. J. Pharm. 2019. Vol. 566. P. 631–640.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-48

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ТОКСИН B *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE*

MONOCLONAL SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES NEUTRALIZE TOXIN B OF *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE*

И. А. Алексеева, А. С. Унгур, И. А. Фаворская, А. И. Тухватулин, Д. В. Щебляков

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

I. A. Alekseeva, A. S. Ungur, I. A. Favorskaya, A. I. Tukhvatulin, D. V. Shcheblyakov

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ alekseeva.irina.21.10.1997@gmail.com

Аннотация

Clostridioides difficile — ведущая причина антибиотик-ассоциированной диареи. Стандартная терапия включает применение антибиотиков, эффективность которых снижается в связи с появлением резистентных штаммов. В качестве альтернативной терапии интерес представляют препараты, направленные на нейтрализацию основных факторов патогенности бактерии — токсинов A и B. В данной работе были получены однодоменные антитела, нейтрализующие действие токсина B.

Abstract

Clostridioides difficile is a leading cause of antibiotic-associated diarrhea. Standard treatment includes the use of antibiotics, but its efficacy has decreased due to the emergence of resistant strains of bacteria. An alternative therapeutic strategy may involve agents that target the key pathogenicity factors of *C. difficile*, toxin A and toxin B. Here, we have isolated monoclonal single-domain antibodies with potent neutralizing activity against toxin B.

Инфекция, ассоциированная с *Clostridioides difficile* (CDI), — инфекционное заболевание, возбудителем которого служат токсин-продуцирующие штаммы бактерии *Clostridioides difficile*. Основными симптомами CDI являются диарея со слизью и кровью, повышенная температура тела, слабость, тошнота, рвота, боли в животе. Тяжелые осложнения инфекции включают перфорации толстого кишечника и токсический мегаколон. С 2003 г. отмечается рост заболеваемости, смертности и рецидивов CDI, в том числе в результате возникновение новых штаммов *C. difficile*, устойчивых к применяемым антибиотикам. Таким образом, актуальной задачей является разработка новых препаратов для лечения CDI.

Основными факторами вирулентности *C. difficile* служат два экзотоксина, токсин A (TcdA) и токсин B (TcdB), ответственные за развитие симптомов заболевания. В связи с этим применение средств, нейтрализующих действие вырабатываемых токсинов, может являться дополнительной стратегией терапии.

Целью настоящего исследования было получение моноклональных однодоменных антител, нейтрализующих TcdB *C. difficile*.

На первом этапе работы была проведена иммунизация двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*). В качестве иммуногена использовалась мутантная неактивная форма токсина B (aTcdB), полученная путем внесения двух мутаций в глюкозилтрансферазный домен. Цикл иммунизации состоял из 8 инъекций, титр нейтрализующих антител в сыворотке после иммунизации составил 1 : 1350 (рис. 1).

Следующий этап работы включал получение библиотеки однодоменных антител иммунизированного животного с помощью методов генной инженерии. Далее полученную библиотеку обогащали клонами антител, распознающими TcdB, с помощью технологии фагового дисплея. Отбор клонов, связывающих TcdB, проводили с помощью иммуноферментного анализа. Всего было проанализировано 376 индивидуальных клонов. Для дальнейшего анализа было отобрано 20 антител к TcdB, относящихся к разным клонотипам и имеющих уникальные аминокислотные последовательности.

На третьем этапе работы были получены и охарактеризованы препараты 20 отобранных клонов однодоменных антител. Продукцию осуществляли в прокариотической системе экспрессии с последующей очисткой с помощью металл-аффинной хроматографии. Оценка способности антител связываться с TcdB показала, что 16 клонов антител взаимодействуют с TcdB с высокой аффинностью.

© И. А. Алексеева, А. С. Унгур, И. А. Фаворская, А. И. Тухватулин, Д. В. Щебляков, 2025

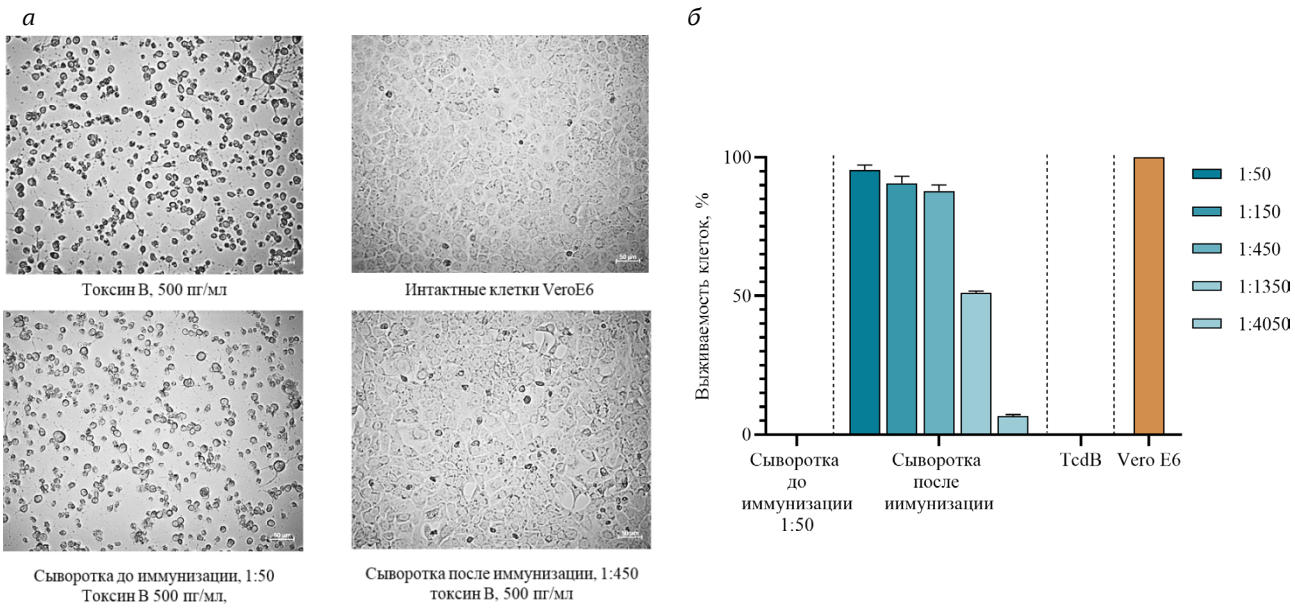


Рис. 1. Анализ нейтрализующих свойств сыворотки верблюда после иммунизации: *а* — фотографии интактных клеток Vero E6, клеток с измененной морфологией под действием токсина B и клеток, обработанных токсином B после инкубации с сывороткой; *б* — определение титра нейтрализующих антител в сыворотке верблюда после иммунизации

Далее была изучена нейтрализующая активность полученных однодоменных антител в отношении TcdB *in vitro* на культуре клеток Vero E6. Проводили анализ способности антител подавлять цитотоксическое действие токсина и препятствовать изменению морфологии клеток, вызванному повреждениями цитоскелета под воздействием TcdB. Было обнаружено, что 3 клона антител обладают высокой нейтрализующей активностью — A3.2, F12.2 и E12.3. Данные клоны нейтрализовали действие токсина с полумаксимальной ингибирующей концентрацией 29,9; 18,7 и 34,7 пМ соответственно (рис. 2).

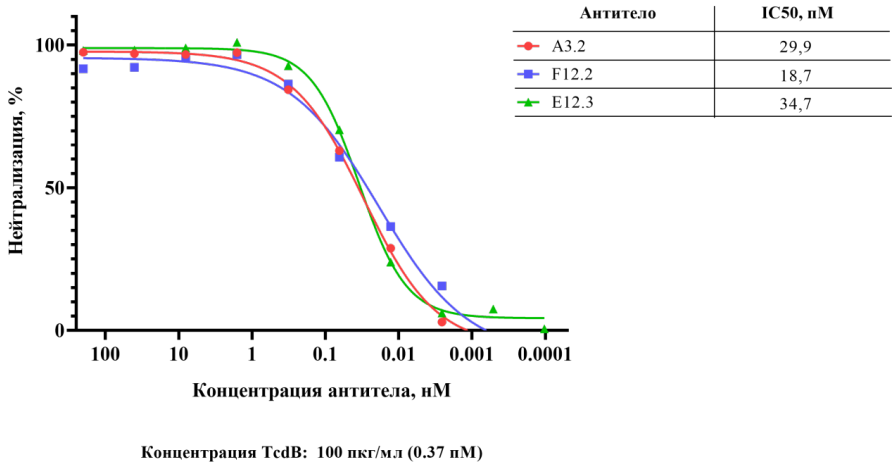


Рис. 2. Определение нейтрализующей активности моноклональных однодоменных антител *in vitro*. Оценку выживаемости проводили по измерению уровня АТФ в клетках через 72 ч после добавления к клеткам токсина B, инкубированного с антителами, в концентрации 100 пг/мл

Таким образом, в результате работы были получены 3 клона однодоменных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью в отношении TcdB *Clostridioides difficile*. В дальнейшем полученные моноклональные однодоменные антитела могут стать основой для разработки средства терапии и профилактики ассоциированной с *Clostridioides difficile* инфекции.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-49

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУРАВЬЯМИ *LASIUS NIGER*

ANTAGONISTIC POTENTIAL OF MYCELIAL ORGANISMS ASSOCIATED WITH ANT *LASIUS NIGER*

П. А. Алексеева, А. Е. Иванова, Ю. В. Закалюкина, Д. А. Бочков

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

P. A. Alekseeva, A. E. Ivanova, Yu. V. Zakalyukina, D. A. Bochkov

Lomonosov Moscow State University

✉ taminn3937@gmail.com

Аннотация

Комплексное изучение взаимодействий между микромицетами и актиномицетами — важное направление современной микробиологии. Оно имеет как фундаментальное значение — для понимания принципов организации микробных сообществ и способности мицелиальных организмов противостоять физиологически активным веществам, выделяемым другими микроорганизмами, так и практическую ценность для разработки биотехнологических продуктов и медицинских препаратов.

Abstract

A comprehensive study of interactions between micromycetes and actinomycetes is an important area of modern microbiology. These studies are of fundamental importance — for understanding the principles of organization of microbial communities and the ability of mycelial organisms to resist physiologically active substances secreted by other microorganisms — and of practical value for the development of biotechnological products and medical preparations.

Изучение сообществ мицелиальных организмов, ассоциированных с муравьями, представляет большой интерес с точки зрения их многообразия и проявления антагонистической активности, а также для создания коллекции культур, являющихся возможными продуцентами антибиотиков.

Целью исследования являлся анализ особенностей таксономического и функционального разнообразия мицелиальных организмов. Объектами исследования были муравьи *Lasius niger*, материалы надземных частей их гнезд, контрольные образцы верхнего горизонта почвы, расположенной на участке злаково-разнотравного луга (Новгородская область, Парфинский р-он), и выделенные из них мицелиальные организмы.

Выявлено, что муравьи *L. niger* являются уникальным местообитанием мицелиальных организмов: на одну рабочую особь приходится в среднем 100 КОЕ микромицетов и 35–445 КОЕ актиномицетов, что в пересчете на 1 г живых особей составляет 25 и 8,7–111 тыс. КОЕ/г соответственно. Высокое обилие актиномицетов выявлено в головном отделе муравья, у микромицетов приуроченность не отмечена. Сравнительный анализ численности грибных КОЕ показал, что в материале гнезд их содержится в 2,2 раза больше, чем в окружающей почве. При этом сходство по набору выявленных видов микромицетов составило 7 совместных видов (9 % от суммарного выявленного разнообразия), что показывает принципиальное отличие муравьиных гнезд от окружающей почвы. Состав сообществ микромицетов может существенно различаться в муравьях, материале их гнезд и окружающей почве, число общих видов во всех трех локусах составляет всего 2,2 %.

Важно отметить, что только в материале муравейников был выявлен как типичный вид *Penicillium camponoti*, исходно выделенный и описанный из местообитания другого вида муравьев — *Camponotus pennsylvanicus*. Находка подтверждает его приуроченность именно к муравьиным местообитаниям. При этом данный вид не проявил антибиотической активности в отношении тест-культур: *B. thuringiensis* VKPM B6650, *Paenibacillus alvei* VKM B502 и штаммов: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus MRSA, Pseudomonas aeruginosa, Streptomyces antimycoticus* GF44-1, *Escherichia coli dtolC, E. coli lptD*, а также в отношении *Saccharomyces cerevisiae*.

Среди отобранных в рабочую коллекцию 117 штаммов микромицетов, принадлежащих к 89 видам, антагонистическая активность к тест-культурам бактерий выявлена у 50 (43 %) штаммов. Наиболее активными являются штаммы, выделенные из самих муравьев, среди них доля активных составляет 64 %, а в числе штаммов, выделенных из материала муравейников, — 47 %. Среди штаммов микромицетов стоит выделить *Aspergillus flavus, A. fumigatus, Fusarium commune, F. oxysporum, F. sporotrichioides, Fusicolla aquaeductuum, Penicillium expansum, P. clavigerum, P. rubens, P. olsonii, P. trzebinskii, P. scabrosum, P. polonicum, P. crustosum, P. brasilianum, P. skrjabinii,*

© П. А. Алексеева, А. Е. Иванова, Ю. В. Закалюкина, Д. А. Бочков, 2025

P. onobense, Purpureocillium lilacinum, Talaromyces kabodanensis, T. kendrickii и *Trichoderma hamatum* как наиболее сильных антагонистов в отношении бактерий на основании ширины зоны задержки роста тест-организма.

При изучении спектра устойчивости микромицетов к различным антимикотикам широкого спектра действия выявлена наибольшая чувствительность микромицетов к нистатину, единичная к клотримазолу и определена устойчивость всех штаммов к амфотерицину.

Установлено, что в наибольшей степени взаимный антагонизм проявляется между штаммами микроорганизмов из разных локусов («муравей — почва»). В то же время для микроорганизмов, изолированных из одинаковых локусов, наблюдается отсутствие или сравнительно низкая выраженность взаимного антагонизма, что свидетельствует о разграничении экониш — сфер влияния. Такая тенденция также продемонстрирована на примере нескольких видов, штаммы которых были выделены из разных локусов.

Тестируемые микромицеты разделились на две группы. В первую группу вошли штаммы, подавлявшие рост актиномицетов. Наиболее активными оказались штаммы 7 видов: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium commune*, *F. oxysporum*, *Penicillium expansum*, *P. rubens* и *Trichoderma hamatum*. Во вторую группу вошли штаммы видов, которые не оказывали влияния на рост актиномицетов и сами не подавлялись актиномицетами. Стоит отметить, что присутствие видов микромицетов (*Penicillium brasilianum, P. crustosum, P. onobense, P. polonicum, P. skrjabinii*), вошедших во вторую группу и проявивших нейтрализм при взаимодействии со всеми исследованными актиномицетами, было обнаружено только в материале гнезд муравьев. Именно поэтому выявление причин отсутствия взаимного антагонизма представляет значительный интерес для будущих исследований.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-50

ИЗУЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ ЭФФЕКТА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ НА ШТАММЫ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ДИНАМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO*

STUDY AND PREDICTION OF THE EFFECT OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS ON GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN AN *IN VITRO* DYNAMIC MODEL

К. Н. Алиева, М. В. Голикова

НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

K. N. Alieva, M. V. Golikova

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

✉ qvimqwem@yandex.ru

Аннотация

Динамическая система *in vitro* — уникальный инструмент исследований фармакодинамики антибиотиков, позволяющий оценивать новые подходы к определению чувствительности бактерий к антибиотикам. Применение полученных результатов может способствовать лучшему прогнозированию эффективности антибиотикотерапии и сдерживанию развития устойчивости грамотрицательных бактерий к бета-лактамным антибиотикам.

Abstract

The dynamic in vitro model is a unique tool for studying the pharmacodynamics of antibiotics, allowing the evaluation of new approaches for antimicrobial susceptibility testing. The use of the obtained results can contribute to better prediction of the effectiveness of antibiotic therapy and restriction of the development of resistance of gram-negative bacteria to beta-lactam antibiotics.

Введение

Динамическая система *in vitro* (модель инфекции) позволяет моделировать характерную для человека фармакокинетику антибиотиков и изучать их эффект на бактерии. Преимущества: высокий уровень стандартизации, широкие настройки условий экспериментов, отсутствие этических трудностей и межвидовой экстраполяции данных. Динамическая система позволяет изучать фармакодинамику антибиотиков и процессы развития устойчивости бактерий, прогнозировать эффективные режимы дозирования антибиотиков и определять фармакокинетико-фармакодинамические параметры, применимые для прогнозирования эффективности антибактериальной терапии и рисков развития устойчивости.

Материалы и методы

Основа системы — биореактор диализного типа. Молекулы антибиотика проникают в поры полупроницаемых мембран. Бактерии остаются в биореакторе, прикрепляясь к мембране или оставаясь в планктонном состоянии, подобно условиям их жизни в макроорганизме. Они подвергаются воздействию антибиотика, вводимого согласно интервалу дозирования.

Исследования проводили с актуальными объектами — меропенемом, комбинацией азтреонам/авибактам и грамотрицательными бактериями *Klebsiella pneumoniae*. Эффект меропенема против 15 штаммов *K. pneumoniae*, включая 8 продуцентов бета-лактамаз, оценивали при моделировании терапевтического режима дозирования: 2000 мг, 3-часовая инфузия каждые 8 ч, период полувыведения 1,4 ч; длительность — 5 суток. Эффект комбинации азтреонам/авибактам против 6 штаммов-продуцентов бета-лактамаз *K. pneumoniae* оценивали при моделировании одобренного за рубежом режима дозирования: 1500 + 500 мг, 3-часовая инфузия каждые 6 ч, период полувыведения 2 ч; длительность — 10 суток. В системе моделировали бактериальную пневмонию, поэтому фармакокинетику препаратов воспроизводили согласно параметрам в эпителиальной жидкости легких [1–3]. На протяжении экспериментов из системы отбирали биопробы, высевали на агар без антибиотиков и с меропенемом или азтреонамом с авибактамом. После культивирования (37 °C, 24–48 ч) оценивали численность клеток общей популяции и устойчивых к антибиотику субпопуляций. Антибактериальный эффект, выраженный как площадь под кривой роста бактерий ППК (меньше площадь — сильнее эффект), анализировали в совокупности с результатами оценки минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков в стандартных [4] и осо-

© К. Н. Алиева, М. В. Голикова, 2025

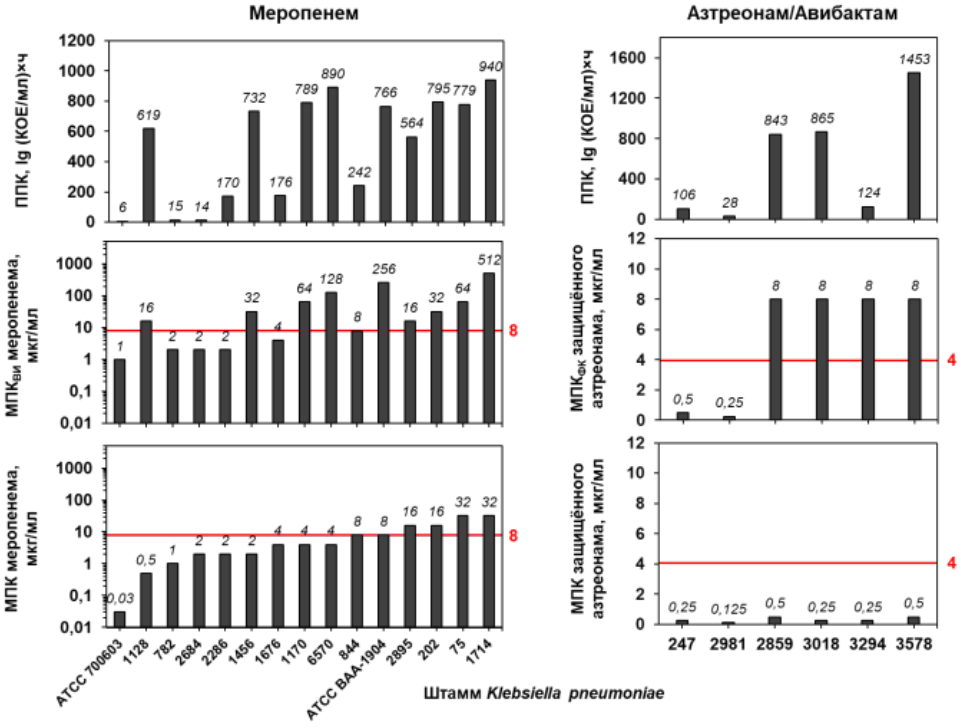
бых условиях: $МПК_{ВИ}$ в случае меропенема (инокулят 5 × 10^7 КОЕ/мл), $МПК_{ФК}$ в случае азтреонама/авибактама (соотношение концентраций 7/1 согласно фармакокинетике препаратов).

Результаты и обсуждение

Меропенем был эффективен в отношении 6 из 7 штаммов клебсиелл без карбапенемаз, и неэффективен против всех 8 продуцентов карбапенемаз, у которых развивалась устойчивость. Значения $МПК_{ВИ}$ позволяли прогнозировать эффект меропенема в отношении штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих и не продуцирующих карбапенемазы (см. рисунок).

Комбинация азтреонама с авибактамом была эффективна в отношении 3 из 6 штаммов *K. pneumoniae*, что лучше согласовывалось с $МПК_{ФК}$ (4 устойчивых штамма), чем с МПК (все штаммы чувствительные) (см. рисунок).

Бета-лактамы, в том числе защищенные ингибитором бета-лактамаз, могут быть неэффективны против продуцентов бета-лактамаз, даже чувствительных согласно стандартным тестам. Новые подходы к определению МПК антибиотиков, проверенные с помощью экспериментов в динамической системе *in vitro*, могут позволить точнее прогнозировать эффективность антибиотикотерапии.



Результаты сопоставления эффекта меропенема и комбинации азтреонам/авибактам и значений МПК, определенных в особых и стандартных условиях. Пороговые значения (8 мкг/мл для меропенема и 4 мкг/мл для азтреонама) согласно EUCAST 2025 [4]

Литература

1. Wenzler E., Gotfried M. H., Loutit J. S. et al. Meropenem-RPX7009 concentrations in plasma, epithelial lining fluid, and alveolar macrophages of healthy adult subjects // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. Vol. 59. P. 7232–7239.

2. Xu H., Zhou W., Zhou D. et al. Evaluation of aztreonam dosing regimens in patients with normal and impaired renal function: a population pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation analysis // J. Clin. Pharmacol. 2017. Vol. 57. P. 336–344.

3. Nicolau D. P., Siew L., Armstrong J. et al. Phase 1 study assessing the steady-state concentration of ceftazidime and avibactam in plasma and epithelial lining fluid following two dosing regimens // J. Antimicrob. Chemother. 2015. Vol. 70. P. 2862–2869.

4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0. 2025. URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf (дата обращения: 31.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-51

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ НА ОСНОВЕ СТИМУЛЯЦИИ И ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА *

DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME BASED ON STIMULATION AND ASSESSMENT OF CHANGES IN THE PRODUCTION OF INTERFERON GAMMA

Н. Ю. Андреева[1], Е. В. Мартынова[1], Ю. Н. Давидюк[1], М. Алсаади[1], В. Г. Шакирова[2], С. Ф. Хайбуллина[1], А. А. Ризванов[1], Э. Кабве[1]

[1]*Казанский (Приволжский) федеральный университет*
[2]*Казанская государственная медицинская академия*

N. Y. Andreeva[1], E. V. Martynova[1], Y. N. Davidyuk[1], M. Alsaadi[1], V. G. Shakirova[2], S. F. Khaibullina[1], A. A. Rizvanov[1], E. Kabwe[1]

[1]*Kazan Federal University*
[2]*Kazan State Medical Academy*

✉ natasha_andreeva_2000@mail.ru

Аннотация

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) остается значимой проблемой в эндемичных регионах РФ. В ряде случаев антитела не обнаруживаются, что затрудняет диагностику. Мы разработали подход к выявлению Т-клеточного ответа при ГЛПС, основанный на стимуляции PBMC рекомбинантным N-белком PUUV с последующей оценкой продукции интерферона-γ. Показана специфическая активация иммунных клеток больных ГЛПС и оптимизированы параметры тест-системы.

Abstract

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) remains a significant public health concern in endemic regions of Russia. In certain cases, specific antibodies are not detected, complicating diagnosis. We developed a test system to assess T-cell responses via stimulation of PBMCs with recombinant PUUV N protein and measurement of IFN-γ. Specific immune activation was confirmed in HFRS patients, and assay conditions were optimized.

Введение

Ортохантавирусы являются зоонозными патогенами, вызывающими геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), характеризующуюся лихорадкой, тромбоцитопенией и нарушением функции почек. В РФ основным возбудителем ГЛПС является *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV). Несмотря на высокую эпидемиологическую значимость, одобренная вакцина против ГЛПС в РФ на сегодняшний день отсутствует, а возможности ранней и надежной диагностики остаются ограниченными [1].

Геном ортохантавирусов состоит из трех сегментов одноцепочечной РНК отрицательной полярности — S, M и L. Сегмент S кодирует нуклеокапсидный белок (N), который является мощным иммуногеном и основным диагностическим антигеном [2]. Целью данного исследования является разработка прототипа IGRA-подобной диагностической тест-системы для оценки клеточного иммунного ответа при ГЛПС, основанной на стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) рекомбинантным N-белком PUUV, и последующего анализа уровня продукции интерферона-γ (IFN-γ).

Материалы и методы

S-сегмент PUUV, кодирующий N-белок, клонировали в плазмидный вектор pET-28a(+). ORF экспрессировали в *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, N-белок очищали с использованием аффинной хроматографии [3]. Очищенный N-белок использовали для стимуляции PBMC. PBMC выделяли из цельной крови пациентов с ГЛПС и у здоровых доноров, следуя стандартному протоколу выделения в градиенте плотности фиколла. Проводили

* Исследование является частью Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© Н. Ю. Андреева, Е. В. Мартынова, Ю. Н. Давидюк, М. Алсаади, В. Г. Шакирова, С. Ф. Хайбуллина, А. А. Ризванов, Э. Кабве, 2025

титрование числа клеток и концентрации антигена. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 в течение 24 часов с рекомбинантным N-белком PUUV в конечных концентрациях от 0,1 до 5 мкг/мл. Определение IFN-γ в культуральной жидкости проводили методом ИФА с использованием коммерческого набора, согласно инструкции производителя.

Результаты

Был экспрессирован и очищен рекомбинантный N-белок PUUV, проявляющий иммуногенные свойства *in vitro* и *in vivo* [3]. В рамках работы выполнено титрование количества PBMC, выделенных из образцов крови пациентов с подтвержденной ГЛПС (n = 10) и здоровых доноров (n = 10), в диапазоне от 50 тыс. до 300 тыс. клеток на лунку. Клетки стимулировались рекомбинантным N-белком PUUV в концентрациях от 0,1 до 5 мкг. Количественное определение продукции IFN-γ проводилось методом ИФА (рис. 1).

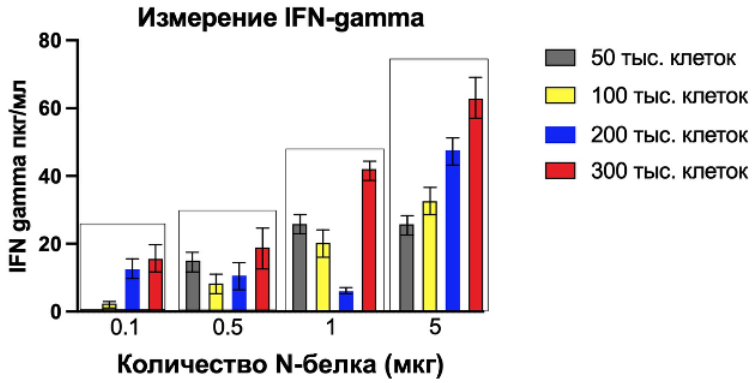


Рис. 1. Титрование PBMC и N-белка для выявления оптимальных условий стимуляции клеточного иммунного ответа

Установлено, что оптимальные параметры стимуляции для разработки диагностической тест-системы составляют 300 тыс. клеток на лунку и 5 мкг N-белка. При данных условиях в группе пациентов с ГЛПС наблюдалась достоверно более высокая продукция IFN-γ по сравнению со здоровыми донорами (p < 0,05). В качестве отрицательных контролей использовались PBMC без антигена и PBMC, инкубированные с бычьим сывороточным альбумином (BSA). В качестве положительного контроля применялся митоген — фитогемагглютинин (PHA) (рис. 2).

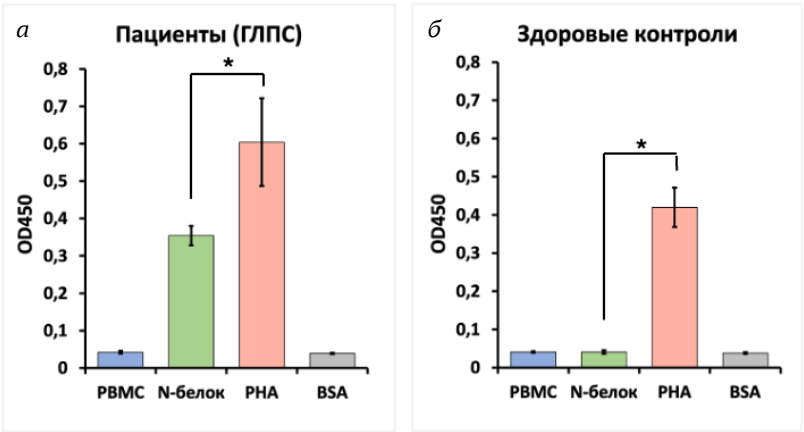


Рис. 2. Продукция IFN-γ клетками PBMC в ответ на стимуляцию N-белком у больных ГЛПС (*а*) (n = 10) и здоровых доноров (*б*) (n = 10); PHA — фитогемагглютинин; BSA — бычий сывороточный альбумин

Полученные данные подтверждают способность рекомбинантного N-белка PUUV индуцировать специфический Т-клеточный ответ у переболевших ГЛПС пациентов. Оптимизированные параметры стимуляции могут быть использованы в качестве основы для разработки IGRA-подобного диагностического теста, направленного на выявление клеточного иммунитета к PUUV.

Выводы

Разработан протокол для оценки продукции IFN-γ клетками PBMC при стимуляции рекомбинантным N-белком PUUV. Показано, что PBMC пациентов, перенесших ГЛПС, продуцируют достоверно более высокие уровни IFN-γ в ответ на антигенную стимуляцию по сравнению с PBMC здоровых доноров. Оптимизированы параметры постановки теста, включая количество клеток (300 тыс. на лунку), концентрацию антигена (5 мкг на лунку) и условия инкубации (24 ч, 37 °C). Полученные результаты подтверждают возможность применения данного подхода в качестве основы для разработки IGRA-подобной диагностической тест-системы, направленной на выявление специфического Т-клеточного ответа к PUUV.

Литература

1. Sehgal A., Mehta S., Sahay K. et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Asia: history, pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention // Viruses. 2023. Vol. 15. P. 561.

2. Jiang H., Zheng X., Wang L. et al. Hantavirus infection: A global zoonotic challenge // Virol. Sin. 2017. Vol. 32. P. 32–43.

3. Andreeva N., Martynova E., Elboeva P. et al. Recovering immunogenic orthohantavirus Puumalaense N protein from pellets of recombinant *Escherichia coli* // Vaccines. 2025. Vol. 13. P. 744.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-52

ПРИМЕНЕНИЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА DOE ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УСЛОВИЙ РАЗРУШЕНИЯ АГРЕГАТОВ FC-СЛИТОГО БЕЛКА

DOE APPROACH TO STUDY THE CONDITIONS OF DESTRUCTION OF FC-FUSION PROTEIN AGGREGATES

П. С. Астрелина, Ю. В. Петрова, А. В. Казакова

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

P. S. Astrelina, Y. V. Petrova, A. V. Kazakova

Pharm Holding CJSC, Saint Petersburg

✉ Polina.Astrelina@geropharm.com

Аннотация

Проведено исследование разрушения агрегатов Fc-слитого белка (64 кДа) с использованием подхода DoE. Изучено влияние ПАВ, восстановителей, хаотропных агентов, спиртов и pH. Результаты раскрывают механизмы белковой агрегации.

Abstract

Screening study of Fc-fusion protein (64 kDa) aggregate disruption using DoE approach. Analyzed surfactants, reductants, chaotropes, alcohols, and pH. Key aggregation mechanisms are described. DoE proved effective for multi-factor analysis.

Агрегация белков представляет собой одну из ключевых проблем, возникающих при их очистке, хранении и использовании, поскольку может существенно влиять на стабильность, растворимость и функциональные свойства молекул. Особое внимание привлекают белки, содержащие Fc-фрагмент, поскольку их структура предрасполагает к образованию агрегатов различной природы. Изучение факторов, способствующих или препятствующих агрегации, позволяет глубже понять механизмы межмолекулярных взаимодействий и может найти применение в широком спектре научных и технологических задач. Статистический подход дизайна эксперимента (DoE, Design of experiments) позволяет эффективно изучить влияние сразу нескольких параметров и их взаимосвязей на этот процесс.

Целью настоящей работы было скрининговое исследование условий, способствующих разрушению агрегатов Fc-слитого белка, с применением статистического подхода DoE. Был проведен анализ нескольких факторов, влияющих на устойчивость и поведение белка в растворе.

В качестве объекта исследования использовали Fc-слитый белок молекулярной массой 64 кДа. Агрегаты получали методом эксклюзионной хроматографии с использованием сорбента Sephacryl S-200 (Cytiva). На основании литературных данных были выбраны пять групп факторов: поверхностно-активные вещества (Tween-80, Tween-20, Triton X-100, Brij®, CHAPs), восстановители (дитиотреитол, цистеин), хаотропные агенты (гуанидина гидрохлорид, мочевина), спирты (изопропанол, глицерин, полиэтиленгликоль), а также значение pH (в диапазоне 7–10). С помощью программного обеспечения MODDE® был составлен дизайн эксперимента, включающий 49 опытов. Эффективность разрушения агрегатов оценивалась по показателям выхода растворимого белка и его чистоте, определяемым методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты показали, что наибольшее положительное влияние на выход белка оказало добавление 1 % Triton X-100 и 1 % Tween-80. Чистота при этом также увеличивалась при добавлении 1 % Triton X-100, 0,1 % Brij® и 0,5 % CHAPs. Среди восстановителей наилучший эффект показал дитиотреитол в концентрации 1 мМ, способствуя улучшению обоих показателей. Из хаотропных агентов положительное влияние на выход оказывал 2 М гуанидин гидрохлорид, при этом его влияние на чистоту было незначительным. Добавление спиртов не оказывало статистически значимого эффекта. Повышение pH среды до 10 стабильно способствовало увеличению как выхода, так и хроматографической чистоты белка.

Результаты показали, что щелочная среда способствует разрушению агрегатов, вероятно, за счет усиления электростатического отталкивания между молекулами. Дитиотреитол эффективно разрушает нецелевые дисульфидные связи, особенно при высоком pH. Положительный эффект гуанидина подтверждает участие электростатических взаимодействий в формировании агрегатов. Поверхностно-активные вещества, такие как Triton X-100,

© П. С. Астрелина, Ю. В. Петрова, А. В. Казакова, 2025

вероятно, действуют за счет взаимодействия с гидрофобными участками белков и стабилизации растворимой формы.

Таким образом, оптимальные условия для разрушения агрегатов Fc-слитого белка включают pH среды 10, а также добавление Triton X-100, гуанидина гидрохлорида и дитиотреитола. Полученные данные позволяют лучше понять физико-химические основы агрегации белков и могут быть полезны при разработке подходов к стабилизации белковых растворов в исследовательской и прикладной областях. Применение подхода DoE продемонстрировало высокую эффективность для комплексного анализа влияния нескольких факторов на поведение белков в растворе и их устойчивость к агрегации.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-53

АНАЛИЗ УРОЖАЙНОСТИ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ГИБРИДОВ F_1 ТОМАТА С КОМПЛЕКСОМ АЛЛЕЛЕЙ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ВЫСОКОЕ НАКОПЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ И КАРОТИНОИДОВ

ANALYSIS OF YIELD AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF F_1 TOMATO HYBRIDS WITH A COMPLEX OF ALLELES DETERMINING HIGH ACCUMULATION OF ANTHOCYANINS AND CAROTENOIDS

О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Мартиновская, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

O. G. Babak, E. V. Drozd, N. A. Martinovskaya, N. V. Anisimova, K. K. Yatsevich, A. V. Kilchevsky

Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk

✉ drozd.liza@bk.ru

Аннотация

Анализ признаков урожайности и биохимического состава плодов гибридов F_1 томата с различным сочетанием аллелей генов качества показал, что наследование ранней, товарной и общей урожайности происходит по типу сверхдоминирования в сторону увеличения значения признака, массы плода — по типу промежуточного наследования, а общего накопления антоцианов и каротина — по типу промежуточного наследования или сверхдоминирования в сторону уменьшения признака.

Abstract

An analysis of yield characteristics and the biochemical composition of fruits of F_1 tomato hybrids with various combinations of quality gene alleles showed that inheritance of early, marketable and total yields occurs by way of overdominance towards an increase in trait value; fruit weight — by way of intermediate inheritance; and the total accumulation of anthocyanins and carotene — by way of intermediate inheritance or overdominance towards a decrease in trait.

Повышение антиоксидантных свойств плодов томата за счет увеличения концентрации таких биологически активных веществ, как антоцианы и каротиноиды, наряду с повышением урожайности создаваемых форм является приоритетной задачей селекционеров. В связи с этим целью работы было изучение сопряженности проявления признаков урожайности, общего накопления антоцианов и каротина у гибридов F_1 с комплексом аллелей генов, определяющих накопление антоцианов и каротиноидов [1].

Созданные 40 гибридов F_1 различались по аллельному составу генов качества плодов (*SlMyb12, Ant1, An2*, *Atv*, *CRTISO, NSY, DET1*, *GLK2*); устойчивости к болезням (*I-2, I-3, I-7*, *Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9*, *Mi-1.2*, *Ph3*, *Ve*, *Tm-2*, *Ty-2, Ty-3*); а также типа роста главного побега (*Sp*) и функциональной мужской стерильности (*Ps-2*). Испытания гибридов проводились в необогреваемых остекленных теплицах на БОС ИГЦ в 2022 г. и необогреваемых карбонатных теплицах УО БГСХА в 2023–2024 гг. По результатам испытаний гибридов установлено, что ранняя урожайность у трех из них была на уровне раннеспелого контроля Евро (3,28–3,68 кг/м^2 плодов). Товарная урожайность на уровне индетерминантного контрольного гибрида Старт также была у трех испытываемых гибридов (от 9,54 до 12,45 кг/м^2). Масса плода достоверно превышала стандартную форму Старт у 8 гибридов (от 85,8 до 117,7 г) [1].

В результате биохимического анализа установлено, что при наличии у форм комплекса аллелей *Ant1/Ant1//An2-Aft/An2-Aft* наблюдается высокое накопление антоцианов в кожице плода от 1083 до 2979 мг на 100 г сырой кожицы плода (скп). У форм с генотипом *ant1/ant1//Myb75/Myb75* наблюдалось низкое накопление антоцианов (56–333 мг/100 г скп). У образцов с генотипом *Ant1/ant1//An2/Myb75* накопление антоцианов было низким либо средним в зависимости от комбинации аллелей генов *DET1* и *GLK2*, определяющих общее накопление пигментов [2].

Анализ общего содержания каротина показал его максимальное значение в плодах у образцов с генотипом *CRTISO/CRTISO//B/B//hp-2^{dg}/hp-2^{dg}//U/U* (21,19 мг на 100 г сырой массы плода (смп)). Высокое накопление каротина наблюдалось также у форм с генотипом *CRTISO/CRTISO//b/b//U/U*. Увеличение количества каротина при этом связано с наличием аллеля *U* гена *GLK2*, повышающего общее количество пигментов в плодах, а также

© О. Г. Бабак, Е. В. Дрозд, Н. А. Мартиновская, Н. В. Анисимова, К. К. Яцевич, А. В. Кильчевский, 2025

отсутствием доминантных аллелей генов *Ant1* и *An2* MYBR2R3 транскрипционных факторов, обеспечивающих высокий синтез антоцианов в плодах. Присутствие в генотипе гомозиготы *u/u*, а также гетерозиготы *u/U-del52* гена *GLK2* приводит к низкому накоплению пигментов. Эти данные подтверждают действие аллелей гена *GLK2* на общее накопление пигментов в плодах томата [2].

По результатам работы отобраны гибриды F_1 с достаточно высокими показателями урожайности и комплексом аллелей, определяющих накопление антоцианов и каротиноидов. Гибриды характеризовались ранней урожайностью 1,22–3,58 кг/м^2, товарной 6,73–9,52 кг/м^2, общей 7,19–10,25 кг/м^2, массой плода 45,14–89,17 г. При этом содержание каротина у гибридов 4Б (*CRTISO/t//B/b//DET1/hp-2^{dg}*), 5Б (*CRTISO/CRTISO//B/b//DET1/hp-2^{dg}*), 8Б (*CRTISO/CRTISO//B/b//DET1/hp-2^{dg}*), ИГЦ8 (*CRTISO/CRTISO//b/b//Y/y//U/u*), ИГЦ2(2) (*t/t//b/b//Y/y// U-del52/U-del52*) составило от 5,94 до 12,06 мг/100 г смп; а содержание антоцианов у гибридов 13Б (*Ant1/ Ant1//An2-Aft /An2-Aft*), 14Б (*Ant1/Ant1//An2-Aft/An2-Aft*), 16Б (*Ant1/ant1//An2-Aft/Myb75*) варьировало от 1225,45 до 1489,18 мг/100 г скп. Гибрид ИГЦ19 (*CRTISO/CRTISO//b/b// y/y//Ant1/ant1//An2-Aft/Myb75//U-del52/u*) содержал 6,73 мг каротина на 100 г смп, а антоцианов — 1580,32 мг/100 г скп. На основании этого данные гибриды являются перспективными для создания продуктов для функционального питания [2].

Анализ степени доминирования анализируемых признаков показал, что у большинства гибридных комбинаций наследование признаков «ранняя урожайность», «товарная урожайность» и «общая урожайность» происходит по типу сверхдоминирования в сторону увеличения значения признака, «масса плода» — по типу неполного доминирования, а признаков «общее накопление антоцианов» и «общее накопление каротина» — по типу неполного доминирования или сверхдоминирования в сторону уменьшения значения признака, что нужно учитывать при выборе родительских форм для получения гибридов с высокими значениями урожайности, накопления антоцианов и каротина в плодах [1, 2].

В результате проведенных исследований гибрид F_1 Спатканне с комплексом аллелей генов качества и устойчивости включен в Государственный реестр сортов сельскохозяйственных растений, превзойдя контрольный гибрид ГСИ (Азарт) на 3,0 кг/м^2, показав товарную урожайность 17,6 кг/м^2 [1].

Литература

1. Бабак О. Г., Дрозд Е. В., Мартиновская Н. А. и др. Анализ признаков продуктивности гибридов F_1 томата *Solanum lycopersicum* L. с комплексом аллелей, определяющих высокое накопление каротиноидов и антоцианов // Молекулярная и генетика. 2025. Т. 38. С. 5–23.

2. Бабак О. Г., Дрозд Е. В., Мартиновская Н. А. и др. Биохимический анализ плодов гибридов F_1 *Solanum lycopersicum* L. С комплексом аллелей, определяющих высокое накопление каротиноидов и антоцианов // Картофелеводство и овощеводство. 2024. Т. 2. С. 11–24.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-54

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО БИОКОРМА НА ОСНОВЕ *NAUPHOETA CINEREA* ДЛЯ РЕАБИЛИТАЦИИ ПТЕНЦОВ НАСЕКОМОЯДНЫХ ПТИЦ

BIOTECHNOLOGY OF LYOPHILIZED BIO-FOOD BASED ON *NAUPHOETA CINEREA* FOR THE REHABILITATION OF CHICKS OF INSECTIVOROUS BIRDS

М. С. Баландина, С. И. Артюхова

Пущинский филиал Российского биотехнологического университета

M. S. Balandina, S. I. Artyukhova

Pushchino Branch of Russian Biotechnological University

✉ asi08@yandex.ru

Аннотация

Представлена биотехнология производства лиофилизированного биокорма со сбалансированным белковым составом на основе *Nauphoeta cinerea* для выкармливания птенцов насекомоядных птиц. Разработанный биокорм для птиц отличается удобством использования (быстрое восстановление водой), увеличенным сроком годности (до 12 месяцев), снижением трудозатрат при выкармливании и может быть использован для 18 изученных видов птиц.

Abstract

The biotechnology of production of lyophilized bio-feed with a balanced protein composition based on *Nauphoeta cinerea* for feeding chicks of insectivorous birds is presented. The developed bio-feed for birds is convenient to use (quick recovery with water), has an extended shelf life (up to 12 months), reduces labor costs during feeding, and can be used for 18 studied bird species.

Выкармливание птенцов насекомоядных птиц в реабилитационных центрах представляет значительные трудности из-за необходимости частого кормления (до 50–100 раз в сутки) и быстрой порчи традиционных кормовых смесей [1]. Существующие методы с использованием живых насекомых или влажных смесей требуют постоянного приготовления свежего корма и значительных временных затрат, что создает дополнительную нагрузку на персонал [2].

Решить эту проблему возможно с помощью альтернативной биотехнологии производства лиофилизированного биокорма на основе *Nauphoeta cinerea*, так как, согласно литературным источникам [3], известно, что лиофилизированная биомасса *Nauphoeta cinerea* характеризуется высоким содержанием белка (около 19,8 %) и оптимальным аминокислотным составом.

Технологический процесс включает этапы глубокой заморозки сырьевых компонентов при −50 °C, последующей лиофилизации в течение 48 ч, измельчения до фракции 50–100 мкм и стандартизации по содержанию БАВ. Полученный биокорм демонстрирует ряд существенных эксплуатационных преимуществ. Порошкообразная форма обеспечивает быстрое восстановление требуемой консистенции при смешивании с водой. Важным достоинством биокорма является пролонгированный срок его годности до 12 месяцев в герметичной упаковке при температуре 4 ± 2 °C.

На основании литературных данных [4–6] и практических испытаний была оценена эффективность биокорма для различных видов птиц (см. таблицу).

Таблица эффективности биокорма для 20 видов насекомоядных птиц

Виды птиц	Подходит	Обоснование	Рекомендации по адаптации	Особые потребности
Стриж	Да	Питается летающими насекомыми	Измельчить, гелевая текстура	Высокобелковый корм + витамин B6
Мухоловка	Да	Питается мягкими насекомыми	Пастообразная форма	+ витамин B6
Дятел	Частично	Нужен более жирный корм	+ личинки зофобаса	Кальций + жиры
Трясогузка	Да	Наземные насекомые	Гранулированная форма	–
Ласточка	Да	Воздушные насекомые	Болюсы из муки	–

© М. С. Баландина, С. И. Артюхова, 2025

Виды птиц	Подходит	Обоснование	Рекомендации по адаптации	Особые потребности
Славка	Да	Всеядна, предпочитает насекомых	Смесь с фруктами	–
Пеночка	Да	Мелкие насекомые	Мелкодисперсный порошок	–
Зарянка	Летом	Летние насекомые	Чистый белок для птенцов: зимой — ягоды	–
Сорокопут	Частично	Крупная добыча	Крупные кусочки	+ кальций
Камышовка	Да	Насекомые у воды	Влажный корм	–
Зяблик	Птенцам	Взрослые особи — семеноядные	Только для кормления птенцов	–
Крапивник	Да	Мелкие беспозвоночные	Мелко молотый корм	–
Чеканка	Да	Ловит насекомых на земле	Гранулы	–
Горихвостка	Да	Летающие насекомые	Паста	–
Соловей	Да	Насекомые в подлеске	Влажная смесь	–
Пересмешница	Да	Разнообразные насекомые	Универсальный корм	–
Козодой	Да	Ночные насекомые	Крупные частицы	–
Жулан	Частично	Крупные насекомые	Увеличить размер частиц	–
Половник	Да	Мелкие пауки и насекомые	Мелкодисперсный	–
Вертишейка	Да	Муравьи и их личинки	+ муравьиная кислота	+ муравьиная кислота

Из 20 изученных видов птиц биокорм показал хорошие результаты для 18 видов птиц (90 %), включая стрижей, ласточек и мухоловок. Для двух видов (дятлов и сорокопутов) потребовалась дополнительная коррекция жирового состава.

В сравнении с традиционными кормами, требующими 15–20 минут на приготовление каждой порции, новый биокорм сокращает этот процесс до 1–2 минут, что существенно повышает эффективность работы реабилитационных центров.

Новый биокорм для птиц демонстрирует высокую универсальность, идеально подходя для 75 % изученных видов птиц (15 из 20 изученных), включая большинство насекомоядных.

Для 20 % видов (4 из 20) биокорм требует адаптации, например добавления жиров и кальция для дятлов и сорокопутов, тогда как для 5 % (1 вид) его применение ограничено.

Рекомендуемая базовая формула включает измельченных тараканов, БАВ, пребиотики, с возможностью модификации для специализированных групп: пастообразная форма для птенцов, обогащение растительными компонентами для зимующих птиц.

Перспективы внедрения биокорма охватывают как реабилитационные центры, благодаря универсальности и простоте использования биокорма (порошки, гранулы, болюсы), так и коммерческое птицеводство, где ключевыми преимуществами являются экологичность и рентабельность (до 40 %). Дальнейшие исследования могут быть направлены на адаптацию биокорма для редких видов, таких как *Ficedula albicollis*, и оптимизацию текстурных вариаций.

Литература

1. MyBirds.ru. Все о певчих птицах. URL: https://www.mybirds.ru/groups/pevch/pevch.php (дата обращения: 25.06.2025).

2. Ярославкина О. А., Фокина М. Е. Особенности выращивания и реабилитации черного стрижа (*Apus apus*) в условиях неволи // Вестник молодых ученых и специалистов Самар. ун-та. 2021. № 1 (18). С. 34–45.

3. Мальцева О. Е., Плешакова И. Н., Дворников Г. Г. Кормовая ценность мраморных тараканов (*Nauphoeta cinerea*) // Современные проблемы зоотехнии и ветеринарии: мат-лы IV Междунар. науч.-практ. конф. Барнаул: Изд-во Алтайского ГАУ, 2023. С. 86–92.

4. Березовиков Н. Н. Методика прижизненного изучения питания гнездовых птенцов насекомоядных птиц // Современные проблемы зоологии и экологии. 2010. № 3. С. 45–52.

5. Прокофьева И. В. Экспериментальные доказательства пластичности питания насекомоядных птиц // Зоологический журнал. 2018. Т. 97, № 5. С. 589–598.

6. Резанов А. Г., Резанов А. А. Оценка разнообразия кормового поведения большого пестрого дятла *Dendrocopos major* // Русский орнитологический журнал. 2010. Т. XIX, № 570. С. 831–860.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-55

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *ANABAENA* SP. IPPAS B-2020

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE STRAIN OF *ANABAENA* SP. IPPAS B-2020

А. Д. Батаева

Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва

A. D. Bataeva

Russian State Agrarian University — Timiryazev Moscow Agricultural Academy

✉ aveatab@mail.ru

Аннотация

Исследованы антиоксидантные свойства культуры цианобактерий *Anabaena* sp. IPPAS B-2020, обладающей фитостимулирующей и фунгицидной активностью. Выраженными антиоксидантными свойствами обладал водный экстракт штамма IPPAS B-2020 в объеме 20 мкл — 39,3 % и 100 мкл — 28,7 %.

Abstract

The antioxidant properties of cyanobacterium *Anabaena* sp. IPPAS B-2020, which has phytostimulating and fungicidal activity, were studied. The aqueous extract of the IPPAS B-2020 strain in a volume of 20 µl — 39.3 % and 100 µl — 28.7 % had pronounced antioxidant properties.

Цианобактерии — морфологически разнообразная группа прокариот, включающая одноклеточные, трихомные и колониальные формы. По характеру клеточной организации они соответствуют грамотрицательным бактериям и представляют самостоятельную ветвь их эволюции. При этом цианобактерии имеют сходство с водорослями и высшими растениями, так как осуществляют фотосинтез с выделением кислорода и содержат хлорофилл *a*, а также ряд других общих с растениями пигментов. Понимание невозможности разграничения видов цианобактерий на основе морфологических признаков пришло с развитием технологии секвенирования ДНК, которая на сегодняшний день является необходимым инструментом для описания новых и ревизии известных видов, определения их границ, проверки традиционных видовых концепций.

Цианобактерии участвуют в почвообразовательном процессе и часто составляют основной фототрофный компонент сообщества микроорганизмов [1]. Одновременно с фотосинтезом цианобактерии фиксируют атмосферный азот, накапливая его в почве до 25–150 кг/га в год и внося существенный вклад в обогащение почвы азотом, тем самым подготавливая ее для заселения другими организмами.

В процессе жизнедеятельности цианобактерии продуцируют комплекс биологически активных метаболитов различного состава, включая белки, углеводы, липиды, органические кислоты, стерины, изопреноиды, гормоны, фенольные соединения, витамины и др. [2]. Среди этих веществ низкомолекулярные органические соединения (НОС) являются одними из наименее изученных. Метаболиты цианобактерий обладают антибактериальными, антиоксидантными, противогрибковыми, фитостимулирующими, аллелопатическими свойствами [3–5]. Поступая в корни растений, они интенсифицируют их рост, увеличивают урожайность сельхозкультур, сокращают сроки созревания, повышают питательную ценность, повышают устойчивость к неблагоприятным факторам, защищают от болезней и выполняют многие другие функции [6, 7].

В экспериментах по определению антиоксидантной активности использовали суспензию клеток *Anabaena* sp. IPPAS B-2020 (3 г сырой биомассы / 100 мл питательной среды), водный и водно-спиртовой экстракты (50/50). Применяли метод колориметрии свободных радикалов, основанный на реакции DPPH (ДФПГ, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, M = 394,33), растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме DPPH* + AH → DPPH-H + A*. В результате восстановления ДФПГ антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска ДФПГ в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 517 нм методом спектрофотометрии. К 1480 мкл этилового спирта 96 % добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл исследуемого образца. Так как с такой концентрацией образцов активность была недостаточно высокой, увеличили соотношение образца к оксиданту, уменьшая при этом объем растворителя — спирта. К 1400 мкл этилового спирта 96 % добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 100 мкл исследуемого образца. В качестве контроля антиоксидантной

© А. Д. Батаева, 2025

активности выбрали аскорбиновую кислоту [8]. К 1480 мкл этилового спирта 96 % добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл раствора аскорбиновой кислоты (1 мг/мл). Аналогично делали раствор с 100 мкл кислоты. Смесь энергично встряхивали и оставляли на 60 мин. Исследования проводили в трех повторностях. Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле: АОА = (Dк – Dоп / Dк) × 100 %, где Dк, Dоп — оптическая плотность (среднее значение) в контрольном и опытном образцах соответственно.

Выраженной антиоксидантной активностью обладал водный экстракт цианобактерий *Anabaena* sp. IPPAS B-2020 в объеме 20 мкл — 39,3 % и 100 мкл — 28,7 %. В объеме 100 мкл высокой активностью обладал также водно-спиртовой экстракт — 27,7 %. В остальных вариантах антиоксидантная активность была ниже контрольной на 6,3–17,2 %. В контроле активность составила 12,5 % (объем 20 мкл) и 25,0 % (объем 100 мкл). В литературе часто встречается информация о цианобактериях — продуцентах фенольных соединений с антиоксидантными свойствами [4]. *Arthrospira platensis, Nostoc muscorum*, *Phormidium foveolarum* продуцировали такие антиоксиданты, как пролин, аскорбат, цистеин и небелковые тиолы. Таким образом, штамм IPPAS B-2020 является перспективным продуцентом соединений, обладающих антиоксидантной активностью.

Литература

1. Bataeva Y. V., Dzerzhinskaya I. S., Yakovleva L. V. Composition of phototrophs in different soil types of Astrakhan oblast // Eurasian Soil Science. 2017. Vol. 50, No. 8. P. 943–951.

2. Dabravolski S. A., Isayenkov S. V. Metabolites facilitating adaptation of desert cyanobacteria to extremely arid environments // Plants. 2022. Vol. 11. P. 3225.

3. Батаева Ю. В., Синетова М. А., Курашов Е. А. и др. Характеристика биологической активности и оценка экзогенных метаболитов цианобактерии Anabaena sp. IPPAS B 2020 // Микробиология. 2024. Т. 93, № 5. С. 519–533.

4. Kumar J., Parihar P., Singh R. et al. UVB induces biomass production and nonenzymatic antioxidant compounds in three cyanobacteria // Journal of Applied Phycology. 2016. Vol. 28. P. 131–140.

5. Bataeva Yu. V., Satkalieva M. S., Antonova S. V. et al. Study of antioxidant activity and composition of cyanobacteria metabolites by TLC, HPTLC, and HPLC for the search of environmentally safe cleaning agents // Russian Journal of General Chemistry. 2018. Vol. 88, No. 13. P. 2898–2902.

6. Цавкелова Е. А. Структурно функциональные особенности микробных сообществ эпифитных орхидей: биоразнообразие, роль и биотехнологическая значимость ассоциативных микроорганизмов: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.02.03 «Микробиология», 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» / Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова. М., 2021. 46 с.

7. Батаева Ю. В. Особенности микробных комплексов аридной зоны в условиях агро и техногенеза и их биотехнологическая значимость: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 1.5.11 «Микробиология», 1.5.6 «Биотехнология» / Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболенск, 2022. 48 с.

8. Астафьева О. В., Жаркова З. В., Генатуллина Г. Н. Исследование фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов соцветий Tagetes patula // Вестн. нов. мед. технол. 2021. Т. 15, № 4. С. 116–120.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-56

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ТУПАЙИ

DETERMINATION OF KINETIC CHARACTERISTICS OF RECOMBINANT TUPAYA CHYMOSIN

Е. А. Белаш, Д. Н. Щербаков

Алтайский государственный университет, Барнаул
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

E. A. Belash, D. N. Shcherbakov

Altai State University, Barnaul
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ ekaterina.belash1@gmail.com

Аннотация

Исследованы кинетические параметры химозинов на синтетических субстратах. Химозин верблюда наиболее эффективен для гидролиза коровьего и верблюжьего субстратов (kcat/Km = 159,4/11,1 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$), тогда как химозин тупайи демонстрирует максимальную каталитическую эффективность в отношении субстрата тупайи (kcat/Km = 27,6 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$). Высокое сродство химозина тупайи к коровьему к-казеину (Km = 0,1 мкМ) указывает на его потенциал для сыроделия.

Abstract

The kinetic parameters of chymosins were studied using synthetic substrates. Camel chymosin showed the highest catalytic efficiency for bovine and camel substrates (kcat/Km = 159.4/11.1 μM^{-1}s^{-1}), while tupai chymosin exhibited maximum efficiency toward the tupai substrate (kcat/Km = 27.6 μM^{-1}s^{-1}). The high affinity of tupai chymosin for bovine κ-casein (Km = 0.1 μM) suggests its potential for cheese production.

Кинетические характеристики являются неотъемлемой частью полной биохимической оценки химозинов, используемых в сыроделии. Рекомбинантный химозин тупайи (*Tupaia belangeri chin ensis*) представляет потенциальный интерес для сыроделия, так как обладает способностью коагулировать молоко коровы и характеризуется низкой термостабильностью.

Цель данной работы заключалась в определении кинетических параметров рекомбинантного химозина тупайи при использовании синтетических пептидов, имитирующих к-казеины коровы, верблюда и тупайи.

Кинетику Михаэлиса — Ментен исследовали методом флуоресцентной спектроскопии с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Измерения проводили в режиме кинетического считывания. Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 480 и 530 нм соответственно, ширина полосы пропускания — 12 нм. Количество считываний — 15, с интервалом 20 секунд. Параметры определяли в трех повторностях. Реакционные смеси готовили в 384-луночном планшете. В каждую лунку вносили субстрат в концентрации от 0 до 20 мкМ в 50 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5,8). Реакцию инициировали добавлением раствора рекомбинантного химозина. Конечная концентрация фермента составляла 5 нМ. В качестве препаратов сравнения использовали рекомбинантный химозин коровы (рХн-Bos) и верблюда (рХн-Cam), в качестве исследуемого — рекомбинантный химозин тупайи (рХн-Tup). Были определены следующие параметры: константа Михаэлиса (Km, мкМ), максимальная скорость реакции (Vmax, нм/с), константа каталитической активности фермента (kcat, с$^{-1}$) и каталитическая эффективность фермента (kcat/Km, мкМ$^{-1}$с$^{-1}$). В качестве субстратов использовались синтетические пептиды, имитирующие участок к-казеина коровы, верблюда и тупайи. Результаты определения кинетических параметров приведены в таблице.

Наиболее эффективным ферментом для гидролиза субстратов, имитирующих к-казеин коровы и верблюда, является рХн-Cam. Это подтверждается его высокой каталитической эффективностью (kcat/Km = 159,4 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$ для субстрата, имитирующего к-казеин коровы и 11,1 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$ для субстрата верблюда). рХн-Tup показывает наибольшую эффективность при гидролизе субстрата, имитирующего к-казеин тупайи (kcat/Km = 27,6 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$). Однако для других субстратов он уступает рХн-Cam, несмотря на высокое сродство к субстрату, имитирующему к-казеин коровы (Km = 0,1 мкМ). рХн-Bos демонстрирует наименьшую каталитическую эффективность для всех

© Е. А. Белаш, Д. Н. Щербаков, 2025

субстратов (kcat/Km = 24,7 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$ для субстрата к-казеина коровы, 2,1 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$ для субстрата к-казеина верблюда и 1,0 мкМ$^{-1}$с$^{-1}$ для тупайи).

Кинетические параметры рекомбинантных химозинов при гидролизе синтетических субстратов

Препарат рХн	**рХн-Bos**	**рХн-Cam**	**рХн-Tup**
Кинетические параметры	Субстрат, имитирующий участок к-казеина коровы		
Km (мкМ)	2,2 ± 0,9	1,4 ± 0,7	0,1 ± 0,05
Vmax (нм/с)	256,8 ± 89,4	174,9 ± 9,3	84,2 ± 27,6
kcat (с$^{-1}$)	50,3 ± 6,9	177,4 ± 11,4	16,8 ± 5,5
kcat/Km (мкМ$^{-1}$с$^{-1}$)	24,7 ± 6,5	159,4 ± 55,6	125,1 ± 39,2
Кинетические параметры	Субстрат, имитирующий участок к-казеина верблюда		
Km (мкМ)	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	1,0 ± 0,5
Vmax (нм/с)	16,9 ± 0,7	36,8 ± 3,0	17,1 ± 6,7
kcat (с$^{-1}$)	2,9 ± 0,1	7,4 ± 0,6	3,4 ± 1,3
kcat/Km (мкМ$^{-1}$с$^{-1}$)	2,1 ± 0,1	11,1 ± 3,3	3,9 ± 1,4
Кинетические параметры	Субстрат, имитирующий участок к-казеина тупайи		
Km (мкМ)	3,8 ± 2,0	4,2 ± 1,8	2,1 ± 0,6
Vmax (нм/с)	15,5 ± 6,5	36,0 ± 8,7	284,5 ± 35,7
kcat (с$^{-1}$)	3,2 ± 1,3	7,2 ± 1,7	56,9 ± 7,1
kcat/Km (мкМ$^{-1}$с$^{-1}$)	1,0 ± 0,4	2,0 ± 1,2	27,6 ± 6,1

В работе [1] было показано, что рХн тупайи продемонстрировал самые низкие значения Km (6,3 мкМ) на субстрате, имитирующем участок к-казеина коровы, по сравнению со стандартами — рХн коровы (12,0 мкМ) и верблюда (20,3 мкМ). Следует отметить, что различия в данной характеристике между результатами, полученными в настоящей работе, составляют 45 раз, хотя общая закономерность более высокой аффинности химозина тупайи к субстрату, имитирующему чувствительный участок к-казеина коровы, подтверждается в обоих исследованиях. Таким образом, разнообразие методик, используемых для определения кинетических свойств, а также зависимость результатов от условий эксперимента и используемых субстратов затрудняют сравнительную оценку свойств ферментов, полученных различными научными группами, что актуализирует важность составления стандартизированной методики.

В ходе исследования все исследуемые химозины продемонстрировали наилучшие кинетические характеристики при использовании в качестве субстрата к-казеина коровы. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования рХн-Tup в качестве альтернативного коагулирующего фермента в сыроделии, особенно для переработки коровьего молока.

Литература

1. Балабова Д. В., Беленькая С. В., Балабова Д. В. и др. Может ли рекомбинантный химозин тупайи (Tupaia belangeri chinensis) коагулировать молоко коровы (Bos taurus)? // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 6. С. 607–618.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-57

РАЗРАБОТКА ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОФИЛЬНОЙ, ПНЕВМОКОККОВОЙ И МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИЙ

DEVELOPMENT OF POLYSACCHARIDE CONJUGATE VACCINES FOR THE PREVENTION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZA* B, PNEUMOCOCCAL AND MENINGOCOCCAL INFECTIONS

А. А. Белянкин, Ф. С. Колмогоров, М. Д. Буланов, Е. Д. Рогова, Э. А. Рузанова, С. О. Рабдано

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России

A. A. Belyankin, F. S. Kolmogorov, M. D. Bulanov, E. D. Rogova, E. A. Ruzanova, S. O. Rabdano

Saint Petersburg Scientific and Research Institute of Vaccines and Serums FMBA of Russia

✉ sevastyan@rabdano.ru

Аннотация

В СПбНИИВС ФМБА России разработаны полисахаридные конъюгированные вакцины полного цикла для профилактики гемофильной, пневмококковой и менингококковой инфекций. Созданная платформа обеспечивает высокую иммуногенность, безопасность и адаптацию под эпидситуацию РФ, укрепляя биомедицинскую независимость страны.

Abstract

At the SPbSRIVS FMBA of Russia full-cycle polysaccharide conjugate vaccines have been developed to prevent Hib, pneumococcal, and meningococcal infections. The platform ensures high immunogenicity, safety, and adaptation to Russia's epidemiological profile, strengthening national biomedical independence.

Инфекции, вызываемые *Haemophilus influenzae* тип b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* и *Neisseria meningitidis*, остаются одними из ведущих причин смертности среди детей до 5 лет во всем мире. Эти патогены характеризуются высоким уровнем носительства, резистентностью к антибиотикам и склонностью вызывать тяжелые осложнения на фоне ослабленного иммунитета. Вакцинопрофилактика признана наиболее эффективным методом борьбы с ними.

Прямое применение полисахаридных вакцин не обеспечивает эффективной защиты у детей младшего возраста из-за Т-независимого механизма иммунного ответа, не формирующего долговременную иммунологическую память. Эту проблему решают полисахаридные конъюгированные вакцины, в которых капсульный полисахарид ковалентно связан с белковым носителем, способным запускать полноценный Т-клеточный ответ.

В СПбНИИВС ФМБА России реализована полная технологическая цепочка производства конъюгированной вакцины против Hib-инфекции — препарата «Бэби-Хиб». Разработка включала: культивирование штамма-продуцента; выделение и очистку капсульного полисахарида (ПРФ); конъюгацию полисахарида с белковым носителем; формуляцию и выпуск готовой вакцины; разработку и валидацию аналитических методик контроля качества промежуточных продуктов, активной фармацевтической субстанции и готовой продукции.

Важным элементом технологии стала оптимизация условий конъюгации, позволяющая сохранить нативную структуру антигена и обеспечить высокую иммуногенность субстанции. Разработка прошла весь цикл доклинических исследований и три фазы клинических испытаний, по результатам которых продемонстрированы безопасность, высокая иммуногенность и хорошая переносимость препарата. Вакцина «Бэби-Хиб» зарегистрирована в РФ и доступна для применения в национальном календаре прививок.

Наработанный научно-технический и производственный опыт стал платформой для создания новых полисахаридных конъюгированных вакцин.

1. **16-валентная вакцина против пневмококковой инфекции**, включающая наиболее распространенные в России и мире серотипы: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15A, 18C, 19A, 19F, 23F, а также 12F, 15A и 22F. Вакцина проходит клинические исследования III фазы.

2. **5-валентная вакцина против менингококковой инфекции**, включающая полисахаридные антигены серогрупп A, C, Y, W, конъюгированные с белковым носителем, а также рекомбинантные белковые компоненты, обеспечивающие защиту от серогруппы B. Препарат находится на стадии клинических исследований II–III фазы.

© А. А. Белянкин, Ф. С. Колмогоров, М. Д. Буланов, Е. Д. Рогова, Э. А. Рузанова, С. О. Рабдано, 2025

Таким образом, СПбНИИВС реализует стратегически важную задачу — создание отечественной платформы конъюгированных вакцин, полностью ориентированной на эпидемиологические особенности Российской Федерации и соответствующей мировым стандартам безопасности и эффективности. Внедрение этих вакцин позволит существенно снизить заболеваемость и смертность от инвазивных бактериальных инфекций у детей, а также укрепит национальную независимость в области биотехнологического производства вакцин.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-58

СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ ДНК-НАНОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ РАЗНЫХ АПТАМЕРОВ К КРИСТАЛЛИЧЕСКОМУ ФИОЛЕТОВОМУ

COMPARISON OF THE PROPERTIES OF DNA NANOSENSORS BASED ON DIFFERENT APTAMERS FOR CRYSTAL VIOLET

Г. А. Бобков[1,2], М. С. Рубель[1], Е. И. Степченкова[2]

[1]*Институт ИТМО, Санкт-Петербург*
[2]*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург*

G. A. Bobkov[1,2], M. S. Rubel[1], E. I. Stepchenkova[2]

[1]*ITMO University, Saint Petersburg*
[2]*Vavilov Institute of General Genetics RAS, Saint Petersburg*

✉ bobkov@scamt-itmo.ru

Аннотация

В работе проведено сравнение флуоресцентных свойств ДНК-наносенсоров, основанных на трех аптамерах, связывающих кристаллический фиолетовый, с различной вторичной структурой. Определены оптимальные условия, соотношения аптамер — краситель и участки разреза. Данные ДНК-наносенсоры могут использоваться в Point-of-Care решениях.

Abstract

This study compares the fluorescence properties of DNA nanosensors based on three aptamers that bind crystal violet and differ in their secondary structure. These DNA nanosensors can be applied to Point-of-Care solutions for pathogen detection. Optimal buffer conditions, aptamer-to-dye ratios, and cleavage sites were determined to improve signal-to-background ratio.

Аптамеры представляют собой одноцепочечные фрагменты ДНК, способные сворачиваться в структуры, обладающие высокой аффинностью к специфическим мишеням. Одним из направлений их применения является создание флуоресцентных биосенсоров (ДНК-наносенсоров). Кристаллический фиолетовый (CV) — краситель, обладающий крайне низкой флуоресценцией в водных растворах, которая значительно усиливается при связывании с гуанинсодержащими участками ДНК, особенно с G-квадруплексными структурами. В данной работе проведено сравнительное исследование трех различных аптамеров к CV — G-квадруплекса с параллельной топологией, G-квадруплекса с антипараллельной топологией и аптамера CV30S, не формирующего G4-структуру, а также ДНК-наносенсоров на их основе.

На первом этапе была проведена оптимизация буферных условий. В оптимальных условиях для каждого аптамера были определены значения флуоресценции и соотношения сигнал/шум. Для CV30S отношение сигнал/фон составило около 9, при интенсивности флуоресценции ~ 13 900 усл. ед. Для параллельного G4-аптамера отношение составляло ~ 2,5, интенсивность ~ 3 400. Антипараллельный G4-аптамер показал наилучшие характеристики с отношением сигнал/фон ~ 11 и интенсивностью ~ 17 000.

Анализ влияния соотношения аптамер — CV при различных концентрациях показал, что для CV30S максимальное значение сигнал/фон составляло ~ 6,5 при определенном соотношении, аналогично для других аптамеров были подобраны оптимальные условия, обеспечивающие максимальный отклик.

Для создания наносенсоров (рис. 1) аптамеры были расщеплены в различных позициях. Для CV30S были протестированы восемь участков и выявлено, что разрез в позиции 2 обеспечивает наилучший отклик, однако участки 8, 3 и 1 также показали удовлетворительные значения (рис. 2).

Дополнительно были оптимизированы соотношения между arm1, arm2 и arm3 ДНК-наносенсоров. Для каждого из трех типов сенсоров (CV30S, параллельный G4, антипараллельный G4) было определено оптимальное соотношение рукавов, обеспечивающее максимальное значение сигнал/фон.

Таким образом, проведено комплексное сравнение трех аптамеров к кристаллическому фиолетовому и разработанных на их основе ДНК-наносенсоров. Показано, что структура аптамера, участок расщепления и геометрия наносенсора существенно влияют на флуоресцентный отклик системы. Представленные подходы могут быть использованы для создания сенсоров в рамках Point-of-Care диагностики.

© Г. А. Бобков, М. С. Рубель, Е. И. Степченкова, 2025

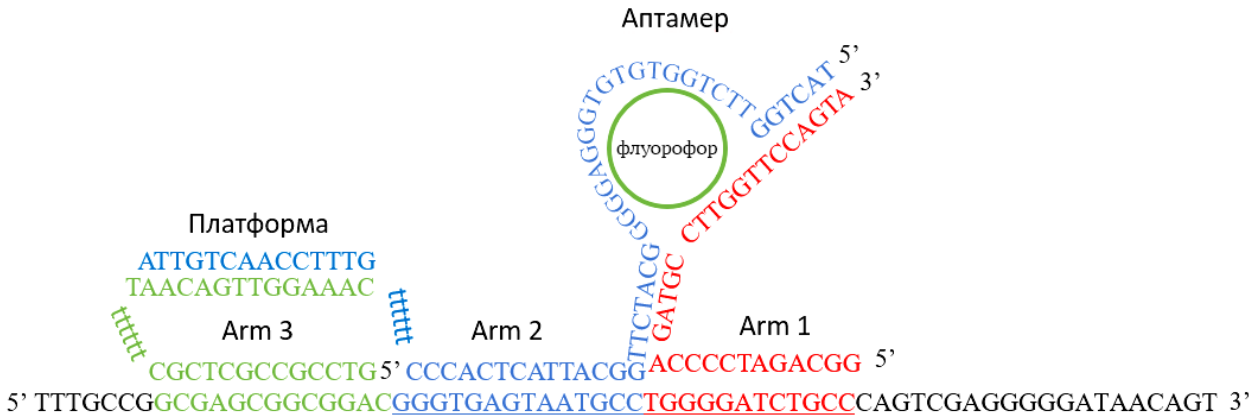


Рис. 1. Схематическое изображение ДНК-наносенсоров с ДНК-переключателем в виде аптамера. Arm 1, Arm 2, Arm 3 — составные компоненты ДНК-наносенсора. Arm 1, Arm 2 также формируют репортерную часть, которая при связывании с исследуемой ДНК формирует необходимую структуру аптамера. Arm 2 и Arm 3 связываются между собой с помощью платформы для увеличения афинности ДНК-наносенсора к детектируемой ДНК последовательности

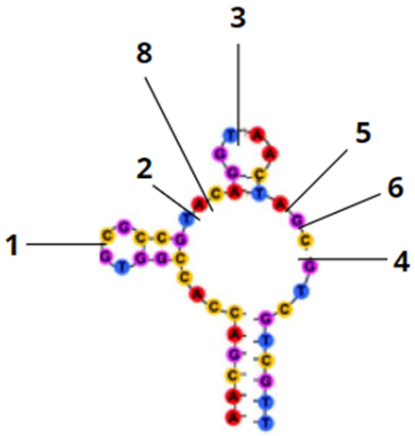


Рис. 2. Изображение структуры аптамера CV30S и точек его разделения для последующего формирования ДНК-наносенсоров

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-59

СОЗДАНИЕ ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИИ ИОННОГО КАНАЛА CFTR

GENERATION OF AN ISOGENIC CELL MODEL USING CRISPR/CAS9 TO STUDY CFTR ION CHANNEL FUNCTIONALITY

А. А. Борисова[1,2], И. Ю. Иванов[1,2], О. Н. Козлов[1,2], А. В. Творогова[1], Т. В. Егорова[1,2], А. В. Панова[1,2]

[1] *Институт биологии гена РАН, Москва*
[2] *ООО «Марлин Биотех», Сочи*

A. A. Borisova[1,2], I. Y. Ivanov[1,2], O. N. Kozlov[1,2], A. V. Tvorogova[1], T. V. Egorova[1,2], A. V. Panova[1,2]

[1] *Institute of Gene Biology RAS, Moscow*
[2] *Marlin Biotech LLC, Sochi*

✉ boriso08@yandex.ru

Аннотация

На основе клеток аденокарциномы кишечника Caco-2 была создана изогенная клеточная линия с биаллельным нокаутом по гену *CFTR*, Caco-2-CFTR-KO. Был разработан протокол 3D-культивирования клеток и показано, что полное отсутствие функционального белка CFTR приводит к развитию патологического фенотипа в форсколин-индуцируемом тесте.

Abstract

An isogenic *in vitro* model was developed based on intestinal adenocarcinoma Caco-2 cells using the CRISPR/Cas9 system to assess ion channel function. The model demonstrates complete absence of functional CFTR protein and exhibits a pathological phenotype in 3D culture.

Муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR) — это ионный канал, регулирующий транспорт Cl^- и HCO_3^- через мембрану эпителиальных клеток. Экспрессия CFTR наблюдается в легких, кишечнике, поджелудочной, потовых и других железах. Мутации в гене *CFTR* приводят к муковисцидозу — тяжелому аутосомно-рецессивному заболеванию, для которого не существует универсального лечения. Наиболее физиологичной *in vitro* моделью для оценки функции ионного канала CFTR являются ректальные органоиды, полученные из биоптатов кишечника пациентов. Они позволяют проводить персонализированный подбор лечения с помощью форсколинового теста. Однако высокая стоимость, трудоемкость культивирования и вариабельность, обусловленная генетическими различиями доноров, ограничивают их использование. Целью данной работы являлось создание универсальной *in vitro* модели муковисцидоза на основе стабильной клеточной линии.

С использованием системы CRISPR/Cas9 мы нокаутировали ген *CFTR* в клетках аденокарциномы кишечника Caco-2, эндогенно экспрессирующих CFTR. Для этого специфичную гидовую РНК, нацеленную на область рядом с кодоном F508, делеция которого является наиболее частой мутацией при муковисцидозе, а также нуклеазу SpCas9 доставляли с помощью вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP. GFP-положительные клетки отбирали на клеточном сортере с последующим клонированием. Для подтверждения успешного редактирования проводили ПЦР-амплификацию целевого локуса *CFTR* с последующим секвенированием по Сэнгеру. Из 17 полученных клонов был выявлен 1 клон с биаллельной нокаутирующей мутацией — вставкой A, приводящей к сдвигу рамки считывания (рис. 1). Кроме того, обнаружены 5 клонов с последовательностью гена *CFTR* дикого типа, 11 клонов с гетерозиготными делециями.

Последующая оценка экспрессии с использованием количественной ОТ-ПЦР показала, что в клетках с биаллельным нокаутом (Caco-2-CFTR-KO) уровень мРНК *CFTR* не изменился. Однако по данным вестерн-блоттинга в клетках Caco-2-CFTR-KO отсутствовал полноразмерный белок CFTR.

При культивировании обеих клеточных линий в матригеле, аналогично кишечным органоидам пациентов, они формировали 3D-органоиды. Мы выявили существенные морфологические различия между органоидами Caco-2-WT и Caco-2-CFTR-KO. В то время как Caco-2-WT формировали поляризованные цисты с центральной полостью [1], клетки с нокаутом по CFTR образовывали плотные структуры без полости.

© А. А. Борисова, И. Ю. Иванов, О. Н. Козлов, А. В. Творогова, Т. В. Егорова, А. В. Панова, 2025

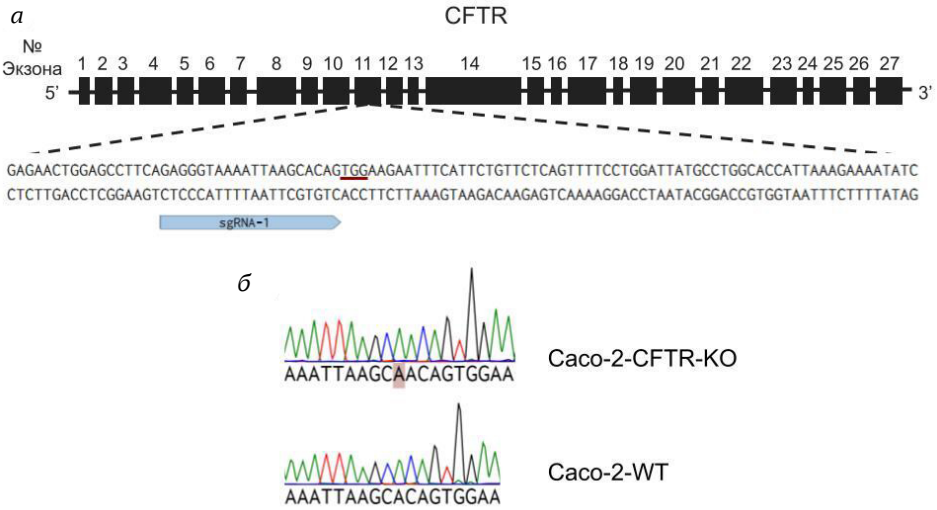


Рис. 1. Нокаут гена *CFTR* в клетках Caco-2 с помощью CRISPR/Cas9: *а* — схематическое изображение целевого участка гена *CFTR* с подобранной sgRNA. Подчеркнутый триплет TGG указывает на положение PAM-сайта; *б* — хроматограммы секвенирования клеток Caco-2-CFTR-KO и Caco-2-WT

Для оценки функции CFTR на органоидах, полученных от пациентов, используется форсколиновый тест. При активации CFTR форсколином хлорид секретируется в просвет цисты, вода и натрий пассивно выходят в том же направлении, что приводит к набуханию органоида. Мы провели форсколиновый тест на полученных нами 3D-структурах: в отличие от Caco-2-WT, демонстрирующих ожидаемое набухание, органоиды из Caco-2-CFTR-KO не формировали полость и не изменили свой объем (рис. 2). Это подтверждает функциональные различия нокаутной по CFTR и родительской линии в отношении транспорта ионов хлора.

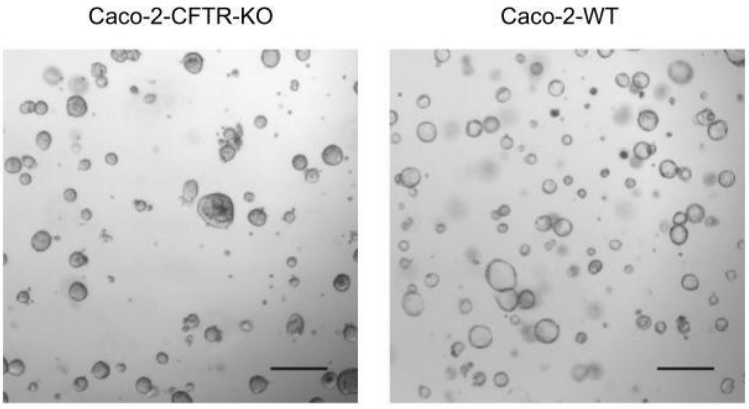


Рис. 2. Форсколиновый тест на клетках Caco-2, масштабная линейка = 250 мкм. *Слева* — органоиды из нокаутных клеток сохраняют плотные структуры без полости после добавления форсколина. *Справа* — органоиды из клеток дикого типа после добавления форсколина набухают и образуют полость

Таким образом, нами была разработана *in vitro* модель муковисцидоза Caco-2-CFTR-KO. Ключевое преимущество полученной модели заключается в полной генетической идентичности с родительской линией аденокарциномы кишечника Caco-2 за исключением целевой мутации в гене *CFTR*, что позволяет минимизировать влияние генетического фона при тестировании различных патогенетических терапий. При переходе к 3D-культивированию Caco-2-CFTR-KO демонстрируют выраженный и воспроизводимый фенотип, что делает разработанную модель перспективной для создания стандартизированного теста функциональной активности CFTR.

Литература

1. Jaffe A. B., Kaji N., Durgan J. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis // The Journal of Cell Biology. 2008. Vol. 183, No. 4. P. 625–633.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-60

ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА РОСТ И ПРОДУЦИРОВАНИЕ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS* *

EFFECTS OF NUTRIENT MEDIA COMPOSITION ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF INDOLYL-3-ACETIC ACID BY BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS*

Е. Е. Бородина[1], Ю. Р. Серазетдинова[1], А. Найк[1], В. С. Евдокимов[2], Л. К. Асякина[1]

[1]Кемеровский государственный университет
[2]ООО «Азот-Агро», Кемерово

E. E. Borodina[1], Yu. R. Serazetdinova[1], A. Naik[1], V. S. Yevdokimov[2], L. K. Asyakina[1]

[1]Kemerovo State University
[2]Azot-Agro LLC, Kemerovo

✉ kborodina1908@gmail.com

Аннотация

Индолил-3-уксусная кислота является важным фитогормоном, продуцируемым микроорганизмами. Целью работы являлось изучение влияния состава питательной среды на рост бактериального консорциума и продуцирование индолил-3-уксусной кислоты. Определено, что среда для большего накопления биомассы и индолил-3-уксусной кислоты имеет следующий состав, г/л: 10,0 триптона; 5,0 дрожжевого экстракта; 10,0 натрия хлористого; 5,0 маннита; 2,0 L-триптофана.

Abstract

Indolyl-3-acetic acid is an important phytohormone produced by microorganisms. The aim of the work was to study the effect of the nutrient medium composition on the growth of the bacterial consortium and the production of indolyl-3-acetic acid. It was determined that the medium for a greater accumulation of biomass and indolyl-3-acetic acid has the following composition, g/l: 10.0 tryptone; 5.0 yeast extract; 10.0 sodium chloride; 5.0 mannitol; 2.0 L-tryptophan.

Фитогормоны, такие как ауксины, цитокинины, абсцизовые кислоты и гиббереллины, участвуют во многих биологических процессах растений. Индолил-3-уксусная кислота (ИУК), как один из наиболее распространенных ауксинов, играет ключевую роль в регуляции физиологических процессов, таких как деление и растяжение клеток, дифференцировка сосудов, гравитропизм и фототропизм. Индолил-3-уксусная кислота может синтезироваться как растениями, так и микроорганизмами [1, 2].

У микроорганизмов фитогормон модулирует образование биопленки, устойчивость к стрессу, биосинтез антибиотиков, продукцию факторов вирулентности, хемотаксис, катаболизм и колонизацию растений [3]. На синтез индолил-3-уксусной кислоты у микроорганизмов оказывает влияние состав питательной среды.

Цель — изучить влияние состава питательной среды на рост и продуцирование индолил-3-уксусной кислоты консорциумом, состоящим из *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 и *Bacillus aryabhattai* B-13192 в соотношении 3 : 1.

Объектом исследования является консорциум, состоящий из *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 и *Bacillus aryabhattai* B-13192 в соотношении 3 : 1, подобранный раннее [4].

Анализ влияния состава питательной среды (табл. 1) на рост проводили на многоканальном персональном биореакторе RTS-8 plus (Biosan, Латвия), при температуре 28 ± 2 °C в течение 24 ч.

Таблица 1

Компонентный состав питательных сред

Образец	Компоненты питательных сред, г/л					
	Триптон	Дрожжевой экстракт	NaCl	Маннит	L-триптофан	$MgSO_4$
Контроль	10	5	10	–	–	–
Среда № 1	10	5	10	5	–	–
Среда № 2	10	5	10	–	2	–

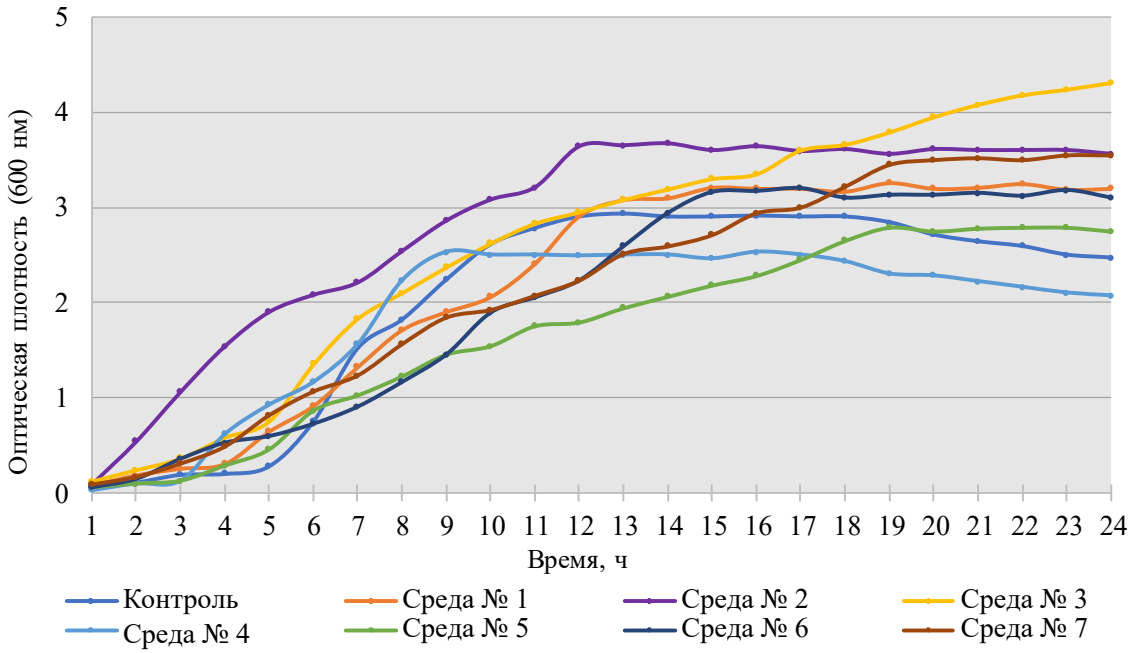
* Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Исследование потенциала ростостимулирующих бактерий для повышения агрономической биофортификации пшеницы» (шифр FZSR-2024-0009).

© Е. Е. Бородина, Ю. Р. Серазетдинова, А. Найк, В. С. Евдокимов, Л. К. Асякина, 2025

Образец	Компоненты питательных сред, г/л					
	Триптон	Дрожжевой экстракт	NaCl	Маннит	L-триптофан	$MgSO_4$
Среда № 3	10	5	10	5	2	–
Среда № 4	10	5	10	–	–	0,2
Среда № 5	10	5	10	5	–	0,2
Среда № 6	10	5	10	–	2	0,2
Среда № 7	10	5	10	5	2	0,2

Анализ индолил-3-уксусной кислоты проводили в соответствии с методом, описанным в ранее опубликованной работе [5].

Результаты анализа влияния питательной среды на рост консорциума представлены на рисунке. Результаты анализа влияния питательной среды на накопления индолил-3-уксусной кислоты представлены в табл. 2.



Анализ влияния питательной среды на рост консорциума

Таблица 2

Результаты анализа содержания индолил-3-уксусной кислоты в культуральной жидкости

Питательная среда	Индолил-3-уксусная кислота, мкг/мл
Контроль	5,44 ± 0,16
Среда № 1	5,80 ± 0,20
Среда № 2	6,32 ± 0,15
Среда № 3	7,08 ± 0,23
Среда № 4	5,19 ± 0,20
Среда № 5	5,51 ± 0,17
Среда № 6	6,03 ± 0,26
Среда № 7	6,55 ± 0,30

Как видно из результатов исследования, среда № 4 является оптимальной для большего накопления биомассы (оптическая плотность спустя 24 ч равна 4,31) и индолил-3-уксусногй кислоты (7,08 мкг/мл). Добавление в питательную среду магния сернокислого привело к снижению скорости роста и продукции ИУК.

Таким образом, для большего накопления биомассы и синтеза индолил-3-уксусной кислоты консорциумом, состоящим из *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 и *Bacillus aryabhattai* B-13192 в соотношении 3 : 1, оптимальным

являлся следующий состав питательной среды, г/л: 10,0 триптона; 5,0 дрожжевого экстракта; 10,0 натрия хлористого; 5,0 маннита; 2,0 L-триптофана.

Литература

1. Zhang B. X., Li P. S., Wang Y. Y. et al. Characterization and synthesis of indole 3 acetic acid in plant growth promoting Enterobacter sp. // RSC Advances. 2021. Vol. 11, No. 50. P. 31601–31607.

2. Фасхутдинова Е. Р., Богачёва Н. Н., Бородина Е. Е. и др. Применение эндофитных микроорганизмов для интенсификации ростовых процессов сельскохозяйственных культур // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54, № 4. С. 820–836.

3. Rico Jiménez M., Muñoz Mira S., Lomas Martínez C. et al. Regulation of indole 3 acetic acid biosynthesis and consequences of auxin production deficiency in Serratia plymuthica // Microbial Biotechnology. 2023. Vol. 16, No. 8. P. 1671–1689.

4. Серазетдинова Ю. Р., Богачёва Н. Н., Фасхутдинова Е. Р. и др. Аспекты совместного культивирования Bacillus amyloliquefaciens и Bacillus aryabhattai для интенсификации синтеза ростостимулирующих веществ // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2024. № 6. С. 41–48.

5. Serazetdinova Yu. R., Borodina E. E., Fotina N. V. et al. Rhizobia as complex biofertilizers for wheat: biological nitrogen fixation and plant growth promotion // Foods and Raw Materials. 2026. Vol. 14, No. 1. P. 214–227.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-61

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ В ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GROWTH PROPERTIES OF NUTRIENT MEDIA FOR DETECTING MYCOPLASMAS IN IMMUNOBIOLOGICAL MEDICINES

М. В. Булатова, Н. С. Куцерубова, С. В. Усова, М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева

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

M. V. Bulatova, N. S. Kutserubova, S. V. Usova, M. P. Bogryantseva, E. A. Nechaeva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ mari.bulatova.90@mail.ru

Аннотация

Загрязнение микоплазмой перевиваемых клеточных культур и коллекционных вирусных штаммов является серьезной проблемой в биотехнологической промышленности. Для их обнаружения наиболее чувствительным является микробиологический метод.

В данной работе был проведен сравнительный анализ ростовых свойств питательных сред HIMEDIA и Thermo Scientific™ Oxoid™. Обе среды показали хороший рост тест-штамма.

Abstract

Mycoplasma contamination of cell cultures and viral strains is a serious problem in the biotechnology industry. The microbiological method is the most sensitive method for detecting mycoplasma.

In this work, a comparative analysis of the growth properties of HIMEDIA and Thermo Scientific™ Oxoid™ nutrient media was conducted. Both media showed good growth of the test strain.

Опасность применения контаминированных микоплазмой иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) состоит в том, что в организме человека микоплазмы способны вызывать острые респираторные и урогенитальные заболевания, артрит и иммунодефицитные состояния, в том числе онкогенные [1, 2].

Для обнаружения микоплазм в исследуемом препарате наиболее чувствительным, простым и экономичным методом является микробиологический (культуральный) метод, основанный на культивировании исследуемого образца в селективных жидких и агаровых питательных средах в условиях, учитывающих потребности соответствующих видов микоплазм [3]. В состав сред, рекомендуемых для обнаружения микоплазм, в качестве основных компонентов входят бульон из экстракта говяжьего сердца и сыворотка крови свиньи или лошади (среды Фрея, Хейфика, Фриса). Также в некоторых средах могут быть добавлены стерильные растворы аргинина и глюкозы**.** Согласно ГФ РФ ОФС.1.7.2.0031.15 для проведения испытания используют питательную среду Каган разной плотности. Среды, аналогичные среде Каган, в фармакопеях для испытания на присутствие микоплазм не прописаны, но допустимо использование альтернативных питательных сред при условии подтверждения их соответствия требованиям по ростовым свойствам в отношении соответствующих штаммов [4].

Целью данной работы являлась сравнительная оценка ростовых свойств питательных сред для обнаружения микоплазм в иммунобиологических лекарственных препаратах.

В качестве объектов исследования были выбраны две коммерчески доступные основы бульона для культивирования микоплазм: Основа бульона для микоплазм без кристаллвиолета, произведенная компанией HIMEDIA (Mycoplasma Broth Base w/o CV (PPLO Broth Base w/o CV)), и Основа бульона для микоплазм (дегидратированная) от Thermo Scientific™ Oxoid™ (Mycoplasma Broth Base (Dehydrated)). В качестве контрольной среды для сравнения использовали среду Каган, содержащую 0,3 % агара. Для оценки ростовых свойств приготовленных сред был использован стандартный тест-штамм Mycoplasma arginini G230. В каждой серии экспериментов использовались 3–4 пробирки с испытуемой средой, в которые вносили 10–100 колониеобразующих единиц (КОЕ) тест-штамма. Инкубация посевов проводилась в термостате при строго контролируемой температуре (37 ± 1) °С в течение 7 суток во влажной атмосфере, которая обеспечивала оптимальные условия для роста микоплазм, предотвращая их высыхание. После завершения инкубации оценивали результаты роста микоплазм, сравнивая их с контрольными

© М. В. Булатова, Н. С. Куцерубова, С. В. Усова, М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева, 2025

пробами. Анализ полученных данных показал эффективность исследуемых питательных сред в отношении обнаружения микоплазм.

Таким образом, исследуемые основы бульона для культивирования микоплазм могут быть использованы в качестве альтернативных питательных сред для обнаружения микоплазм в иммунобиологических лекарственных препаратах.

Литература

1. Леонович О. А. Микоплазма: свойства, методы обнаружения и деконтаминации клеточных культур и вирусных штаммов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2024. Т. 60, № 5. С. 435–444.

2. Суханова С. М., Бердникова З. Е., Тихонова А. С. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2019. Т. 19, № 3. С. 161–168.

3. Huang X., Yu M., Wang B. et al. Prevention, diagnosis and eradication of mycoplasma contamination in cell culture // Journal of Biological Methods. 2023. Vol. 10, No. 1. Art. 1.

4. Общая фармакопейная статья «Испытание на присутствие микоплазм» // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. 2018. ОФС. 1.7.2.0031.15.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-62

ОЦЕНКА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT И ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ AKT ПЕРИФОЗИНА НА КЛЕТКИ ГЛИОМЫ И МИКРОГЛИИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* *

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF THE ONCOLYTIC VIRUS VV-GMCSF-LACT AND THE AKT KINASE INHIBITOR PERIFOSINE ON HUMAN GLIOMA AND MICROGLIAL CELLS *IN VITRO*

А. А. Бывакина[1,2], Н. С. Васильева[1]

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

A. A. Byvakina[1,2], N. S. Vasileva[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ mytrilliangalaxy@gmail.com

Аннотация

VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью и противоопухолевой эффективностью в отношении клеток иммортализованных линий и персонализированных культур глиом человека на различных *in vitro* и *in vivo* моделях. Использование онколитических вирусов в комбинации с другими противоопухолевыми агентами является перспективным терапевтическим подходом, поскольку позволяет преодолеть устойчивость опухолевых клеток к лечению.

Abstract

VV-GMCSF-Lact has high cytotoxic activity and antitumor efficacy against immortalized and personalized human glioma cell cultures in various *in vitro* and *in vivo* models. The use of oncolytic viruses in combination with other antitumor agents is a promising therapeutic approach, as it allows overcoming the resistance of tumor cells to treatment.

Виротерапия — одно из наиболее активно развивающихся направлений в лечении глиом, однако существуют механизмы, способные обеспечивать устойчивость опухолевых клеток к действию онколитических вирусов. Мы показали, что чувствительность клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact обратно зависит от уровня активированной киназы Akt, которая участвует в процессах ингибирования апоптоза и, соответственно, может являться мишенью при таргетной терапии глиальных опухолей. Поскольку онкотоксический белок лактаптин, продуцируемый VV-GMCSF-Lact, индуцирует апоптотическую гибель опухолевых клеток по митохондриальному пути, использование ингибитора киназы Akt перифозина в комбинации с VV-GMCF-Lact может быть весьма перспективным для лечения глиом.

Таким образом, цель данной работы — исследование совместного действия VV-GMCSF-Lact и перифозина в отношении клеток иммортализованных линий (U87 MG, U343 MG) глиом и клеток HMC3 микроглии человека.

Согласно полученным ранее данным, клетки U87 MG (CD50 = 0,1 БОЕ/клетку) более устойчивы к действию VV-GMCSF-Lact по сравнению с клетками U343 MG (CD50 = 0,06 БОЕ/клетку). При этом мы показали, что клетки HMC3 микроглии человека также чувствительны к действию вируса VV-GMCSF-Lact (CD50 = = 0,41 БОЕ/клетку), но демонстрируют большую устойчивость к онколитическому вирусу, чем клетки глиом.

При оценке жизнеспособности клеток глиом человека под действием VV-GMCF-Lact и перифозина показано, что ингибитор киназы Akt усиливает цитотоксический эффект онколитического вируса вне зависимости от чувствительности клеток исследуемых культур к действию препаратов. При этом совместное действие VV-GMCSF-Lact и малых концентраций перифозина в отношении клеток U343 MG, напротив, характеризуется антагонистическим эффектом, что, вероятно, связано с особенностями клеточной линии. Усиление цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток HMC3 микроглии человека при добавлении перифозина было показано лишь при низкой концентрации вируса.

Для исследования апоптотических процессов в клетках глиом человека под действием перифозина и VV-GMCSF-Lact использовали метод проточной цитометрии при окрашивании Аннексином V и йодидом про-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-14-00390).

© А. А. Бывакина, Н. С. Васильева, 2025

пидия. Согласно данным цитометрического анализа использование комбинации препаратов в отношении клеток U343 MG приводит к увеличению количества клеток глиомы, находящихся на ранних стадиях апоптоза. При применении комбинации перифозина и VV-GMCSF-Lact на клетках U87 MG число мертвых клеток увеличивается по сравнению с обработкой клеток только перифозином или только вирусом.

Таким образом, использование ингибитора киназы Akt в комбинации с VV-GMCF-Lact является перспективным терапевтическим подходом в отношении глиом человека, поскольку комбинация препаратов усиливает апоптотическую гибель опухолевых клеток под действием вируса, что позволяет уменьшить дозу VV-GMCSF-Lact и, как следствие, минимизировать возможные токсические эффекты виротерапии, что важно при лечении внутричерепных опухолей.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-63

СРАВНЕНИЕ УДАЛЕНИЯ МАРГАНЦА ИЗ ВОДНОЙ СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КВАРЦЕВОГО ПЕСКА И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НЕМ КЛЕТОК *BACILLUS MEGATERIUM* 69.5

COMPARISON OF MANGANESE REMOVAL FROM AQUATIC ENVIRONMENTS USING QUARTZ SAND AND IMMOBILIZED *BACILLUS MEGATERIUM* 69.5 CELLS

К. Ю. Варюхина, Е. В. Плешакова

Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского

K. Yu. Variukhina, E. V. Pleshakova

Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevsky

✉ karina-karina2005@mail.ru

Аннотация

Загрязнение вод повышенными концентрациями марганца (II) является актуальной проблемой современности. Действенными считаются биологические методы деманганации природных и сточных вод. В работе произведена сравнительная оценка эффективности удаления Mn (II) из водной среды с использованием кварцевого песка и иммобилизованными на нем клетками марганецокисляющего микроорганизма *Bacillus megaterium* 69.5.

Abstract

Water pollution with elevated concentrations of manganese (II) is a pressing problem of our time. Biological methods of demanganization of natural and wastewaters are considered effective. The paper provides a comparative assessment of the efficiency of Mn (II) removal from the aquatic environment using quartz sand and immobilized cells of the manganese-oxidizing microorganism *Bacillus megaterium* 69.5.

Эффективным способом очистки природных и сточных вод от тяжелых металлов, в том числе марганца, является применение биофильтров — сооружений, в которых вода фильтруется через загрузочный материал, покрытый биопленкой из колоний микроорганизмов [1]. В качестве загрузочного материала может быть использован кварцевый песок, обладающий способностью к адсорбции ионов марганца [2]. Иммобилизация на таком носителе марганецокисляющих микроорганизмов может повысить качество очистки за счет биологического окисления соединений Mn (II).

Цель настоящих исследований состояла в сравнении эффективности удаления Mn (II) из водной среды с использованием кварцевого песка и иммобилизованных на нем клеток *Bacillus megaterium* 69.5. Микробный штамм *B. megaterium* 69.5 был выделен ранее из высокомагнитной почвы г. Медногорска (Оренбургская область, Россия). Последовательность 16S рРНК *B. megaterium* 69.5 зарегистрирована в GenBank NCBI под номером MK764687. Было установлено, что через 7 сут. периодического культивирования данного микроорганизма в жидкой среде с 2 ммоль/л Mn (II) вес его сырой биомассы увеличивался в 5,5 раза, содержание Mn (II) в среде культивирования снижалось на 50 % [3].

Настоящие исследования проводили в лабораторных условиях по модифицированной методике, описанной A. Piazza с соавт. [4]. На первом этапе подготавливали *B. megaterium* 69.5 для иммобилизации. 1. Получали суспензию суточной культуры микроорганизмов, отделяли клетки центрифугированием, определяли величину сырой биомассы гравиметрическим методом. 2. Осадок микробных клеток перерастворяли в LB-среде для достижения массы микроорганизмов 0,5 или 1 г/л по сырому весу, по 50 мл приготовленной суспензии помещали в 0,25-литровые колбы Эрленмейера с 80 г предварительно стерилизованного кварцевого песка (фракция 0,2–0,5 мм), инкубировали в настольном шейкере-инкубаторе PSU-10i (BioSan, Латвия) при 160 об/мин и температуре 22–24 °С в течение 5 сут. В качестве контроля использовали песок, не инокулированный микроорганизмами. Каждый вариант изучали в трех повторностях. На втором этапе удаляли культуральную среду из колб, промывали песок стерильной водой и вносили по 50 мл селективной среды с 2 ммоль/л Mn (II) [5], инкубировали в течение 7 сут. в настольном шейкере-инкубаторе. На третьем этапе определяли убыль Mn (II) в среде культивирования согласно ГОСТ 4974-2014 [6]. Исследования проводили: а) при pH 7 и исходной массе *B. megaterium* 69.5 1 г/л; б) при pH 3 и исходной массе 0,5 г/л.

© К. Ю. Варюхина, Е. В. Плешакова, 2025

В результате экспериментов было установлено, что при pH 7 убыль Mn (II) в среде с кварцевым песком составила 95,3 %. Убыль металла в среде после иммобилизации *B. megaterium* 69.5 на песке отличалась незначительно, составляя 96,2 %. При pH 3, несмотря на то что масса *B. megaterium* при иммобилизации была в 2 раза ниже, убыль Mn (II) была высокой. В среде с иммобилизованными микроорганизмами убыль составила 89,2 %, в контрольном образце с кварцевым песком без микроорганизмов была ниже — 85,8 %.

Полученные данные доказывают эффективность использования кварцевого песка в качестве фильтрующего материала для удаления марганца, в то же время иммобилизованные на кварцевом песке клетки *B. megaterium* 69.5 незначительно улучшали удаление Mn (II) из водной среды, в кислой среде эффект был более заметен. Планируются дальнейшие исследования возможных биофильтров и параметров их функционирования.

Литература

1. Гудков А. Г. Биологическая очистка городских сточных вод: учеб. пособие. Вологда: ВоГТУ, 2002. 127 с.

2. Велюго Е. С., Ермак А. А., Ющенко В. Д. Гидрохимические модели удаления железа и марганца на кварцевом песке и сорбенте АС // Вестн. Полоц. гос. ун-та. Серия F. Строительство. Прикладные науки. 2025. № 2. С. 23–30.

3. Касаткина М. А., Решетников М. В., Плешакова Е. В. Изучение биологических и функциональных свойств микроорганизмов с высокой устойчивостью к марганцу (II) // Изв. Сарат. ун-та. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, Вып. 3. С. 318–330.

4. Piazza A., Ciancio Casalini L., Pacini V. A. et al. Environmental bacteria involved in manganese (II) oxidation and removal from groundwater // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. P. 119.

5. Захарова Ю. Р., Парфенова В. В. Метод культивирования микроорганизмов, окисляющих железо и марганец в донных осадках оз. Байкал // Изв. РАН. Сер. Биол. 2007. № 3. С. 290–295.

6. ГОСТ 4974-2014. Вода питьевая. Определение содержания марганца фотометрическими методами. М.: Стандартинформ, 2015. 23 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-64

ЦИРКОВИРУС СВИНЕЙ ВТОРОГО ТИПА: СТРАТЕГИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ

PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2: A STRATEGY FOR DEVELOPING A RECOMBINANT VACCINE

С. А. Васильев, И. Н. Матвеева

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Московская область

S. A. Vasiliev, I. N. Matveeva

All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Moscow region

✉ stepanvasilev0451@gmail.com

Аннотация

В статье представлен обзор современных рекомбинантных вакцин против PCV2 на основе капсидного белка ORF2. Рассмотрены платформы экспрессии, механизмы иммунного ответа и перспективные технологии (VLP, мРНК).

Abstract

The article presents an overview of modern recombinant vaccines against PCV2 based on the ORF2 capsid protein. Expression platforms, immune response mechanisms and promising technologies (VLP, mRNA) are considered.

Цирковирусы свиней (PCV) — это небольшие сферические вирусы без оболочки, состоящие из кольцевой одноцепочечной геномной ДНК в икосаэдрическом капсиде. Эти вирусы относятся к роду цирковирусы семейства *Circoviridae*. Цирковирусы характеризуются высокой генетической изменчивостью и имеют четыре известных генотипа: PCV1, PCV2, PCV3 и PCV4.

PCV1 считается непатогенным, в то время как PCV2 является возбудителем заболеваний, ассоциированных с PCV2 (PCVAD). PCV3, впервые выявленный в 2016 г. с помощью метагеномного секвенирования, связан с синдромом дерматита и нефропатии свиней (PDNS), заболеваниями сердца, репродуктивной недостаточностью, респираторными заболеваниями и т. д. [1].

Наиболее широкое распространение и патогенность на данный момент имеет цирковирус свиней второго типа.

Коммерческие вакцины против PCV2 делятся на две основные категории: инактивированные вакцины и субъединичные вакцины, в которых в качестве иммуногена используется капсид.

Традиционные инактивированные и аттенуированные вакцины имеют ряд ограничений, ключевым из которых является необходимость многократного введения, что приводит к необходимости в разработке рекомбинантных вакцин.

Субъединичная вирусная вакцина изготавливается из компонентов основного иммуногена вируса с помощью генной инженерии. Были разработаны и произведены коммерческие субъединичные вакцины PCV2, главным образом на основе ORF2 [2]. Капсульный белок содержит нейтрализующие эпитопы, поэтому он способен вызывать защитные иммунные реакции, но при этом безопасен, так как не содержит генетического материала вируса и способен модифицироваться для большей экспрессии. Современные широко используемые вакцины против цирковируса свиней 2-го типа (CircoflexTM, Circumvent и Porcilis PCV®) основаны на использовании экспрессии ORF2 [3].

Иммунный ответ развивается по следующему сценарию: антигенпрезентирующие клетки поглощают ORF2, что приводит к активации В-лимфоцитов и последующей выработке специфических антител (преимущественно IgG). Важно отметить, что такая вакцинация способствует формированию иммунологической памяти.

Принцип создания такой вакцины начинается с клонирования гена, кодирующего капсидный белок ORF2, в бактериальную плазмиду. После трансформации бактерий происходит экспрессия целевого белка, который часто накапливается в виде включений. Затем белок подвергают многоступенчатой очистке и формулируют с адъювантом для усиления иммунного ответа. Готовая вакцина вводится свиньям, как правило внутримышечно [4].

© С. А. Васильев, И. Н. Матвеева, 2025

Ключевым вопросом при разработке такой вакцины является выбор платформы для экспрессии целевого белка, широко используется экспрессия в клетках *Escherichia coli*, бакулавирусная система экспрессии, вирусные векторные вакцины, мРНК-вакцины и наработка белка в клетках дрожжей *Pichia pastoris*.

Каждая из описанных платформ имеет свои уникальные преимущества и ограничения, что позволяет выбирать оптимальную технологию в зависимости от конкретных задач и экономических условий [1]. Современные тенденции указывают на постепенный переход к более совершенным системам (VLP, мРНК), обеспечивающим лучший иммунный ответ при минимальных побочных эффектах.

Литература

1. Palinski R., Piñeyro P., Shang P. et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure // Journal of Virology. 2017. Vol. 91, No. 1. Art. e01879-16.

2. Beach N. M., Meng X. J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2) // Virus Research. 2012. Vol. 164. P. 33–42.

3. Silva J. G., Coimbra E. C., Jesus A. L. et al. Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in Pichia pastoris // Journal of Virological Methods. 2014. Vol. 207. P. 226–231.

4. Segales J., Allan G. M., Domingo M. Porcine circovirus diseases // Animal Health Research Reviews. 2005. Vol. 6, No. 2. P. 119–142.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-65

ИЗУЧЕНИЕ РЕПАРАТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА PRP ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ НАРУШЕНИЕМ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

STUDY OF THE REPARATIVE POTENTIAL OF PRP IN PATIENTS WITH ACUTE INFLAMMATORY PROCESS

Т. И. Власова[1], Е. П. Бродовская[1,2], К. С. Мадонов[1], А. П. Абелова[1]

[1] *Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск*
[2] *Федеральный центр развития биотехнологий и медицины, Саранск*

T. I. Vlasova[1], E. P. Brodovskaya[1,2], K. S. Madonov[1], A. P. Abelova[1]

[1] *Ogarev National Research Mordovia State University, Saransk*
[2] *Federal Center for Biotechnology and Medicine Development, Saransk*

✉ abelova.ann@yandex.ru

Аннотация

Одним из применяемых методов лечения в регенеративной медицине является богатая тромбоцитами плазма (PRP) [1]. PRP — высокоэффективный аутологичный продукт, содержащий высокую концентрацию тромбоцитов, которые при активации высвобождают более 300 молекул, стимулирующих заживление тканей [2]. Однако по ряду причин действие препарата может существенно ухудшаться [3]. В исследовании выполнен анализ влияния сахарного диабета (СД) на терапевтические свойства PRP.

Abstract

One of the treatment methods used in regenerative medicine is platelet–rich plasma (PRP) [1]. PRP is a highly effective autologous product containing a high concentration of platelets, which, when activated, release more than 300 molecules that stimulate tissue healing [2]. However, a number of reasons can significantly worsen the effect of the drug [3]. The study analyzes the effect of diabetes mellitus on the therapeutic properties of PRP.

Цель — определить влияние СД на регенеративные свойства PRP путем оценки пролиферативной, миграционной, метаболической и секреторной активности дермальных фибробластов человека после их стимуляции PRP разных групп.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 2 группы пациентов: 1-ю группу (К1) составили условно здоровые лица 30–40 лет, 2-ю группу (СД1) — больные СД той же возрастной категории. В общем анализе крови количество тромбоцитов достигало для К1 239,00 [232,75; 245,25]/μл, для СД1 — 212,00 [204,00; 217,00]/μл. PRP была получена с помощью одноэтапного центрифугирования. В готовых образцах число изучаемых форменных элементов у К1 достигло Me [IQR]: 647,0 [615;663]/μл, у СД1 — 623,0 [598;654]/μл.

Работа проведена с использованием иммортализованных дермальных фибробластов человека hTERT-HDFa (d220), предоставленных УНУ «Коллекция клеточных культур» ИБР РАН. Для реализации группы экспериментов предварительно замороженную плазму в концентрации 10 % активировали $CaCl_2$ (20 μл/мл). В качестве отрицательного контроля 0 (К) выбраны образцы без добавления PRP, а положительного 0 (К 10 % FBS) — пробы с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS).

Метаболическая активность клеток оценивалась с помощью МТТ-теста в течение 24, 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивалась относительно 0 (К), взятого за 100 %.

Секреторная активность клеток анализировалась в течение 2,4 и 24 ч путем оценки степени окисления 2′,7′-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (Lumiprobe, Россия). Изучение миграционной и пролиферативной активности проведено *in vitro* (scratch assay) через 0 и 24 ч. С помощью проточного цитометра устанавливалось количество экзосом.

© Т. И. Власова, Е. П. Бродовская, К. С. Мадонов, А. П. Абелова, 2025

Результаты

Через 24 ч после внесения PRP СД1 метаболическая активность и жизнеспособность фибробластов были значительно снижены как в сравнении с 0 (К) и 0 (К 10 % FBS), так и в сравнении с К1. Показатели К1 были сопоставимы с 0 (К 10 % FBS), где жизнеспособность оказалась наивысшей.

Через 48 ч после наблюдения за обеими группами показатель жизнеспособности клеток был выше относительно 24 ч. Однако через 72 ч в группе К1, в отличие от группы СД1, метаболическая активность клеток снизилась ввиду увеличения их числа.

В группе СД1 генерация АФК была достоверно выше относительно 0 (К 10 % FBS) и К1.

Внесение PRP СД1 увеличило число некрозов фибробластов в 7–15 раз ($p < 0{,}001$) относительно К1. Статистически значимых межгрупповых различий по параметру «Апоптоз клеток» выявлено не было.

Через 48 ч регистрировали полное закрытие раны, поэтому достоверных различий между группами при оценке миграционной и пролиферативной активности ДФЧ после стимуляции PRP выявлено не было. Такие же результаты были получены при анализе секреторной активности клеток и количества экзосом.

Выводы

Таким образом, выявлено, что PRP пациентов с СД обладает более выраженными прооксидантными свойствами, чем PRP условно здоровых доноров. Отмечено, что внесение PRP СД1 существенно снижает метаболическую активность и жизнеспособность ДФЧ, что может быть обусловлено токсическими веществами плазмы. Увеличение некроза также ассоциировано с СД, а повышенный синтез АФК влечет за собой снижение пролиферативной активности клеток. Проведенные исследования открывают новые направления в изучении путей повышения эффективности PRP-терапии при заболеваниях, в том числе с СД.

Литература

1. Makarevich P. I., Tkachuk V. A. Fundamental and Practical Perspectives in Regenerative Medicine // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25 (21).

2. Everts P. A., Lana J. F., Alexander R. W. et al. Profound Properties of Protein-Rich, Platelet-Rich Plasma Matrices as Novel, Multi-Purpose Biological Platforms in Tissue Repair, Regeneration, and Wound Healing // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25 (14).

3. Mastrogiacomo M., Nardini M., Collina M. C. et al. Innovative Cell and Platelet Rich Plasma Therapies for Diabetic Foot Ulcer Treatment: The Allogeneic Approach // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 10.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-66

ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗАТОРОВ ЦИТРАТА НАТРИЯ И КОЛЛАГЕНА НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

EFFECT OF SODIUM CITRATE AND COLLAGEN STABILIZERS ON THE CATALYTIC PROPERTIES OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

В. В. Войнаровский, К. А. Кучмурадов, И. В. Мартинович, Г. Г. Мартинович

Белорусский государственный университет, Минск

V. V. Voinarovski, K. A. Kuchmuradov, I. V. Martinovich, G. G. Martinovich

Belarusian State University, Minsk

✉ voynarovskiy197@mail.ru

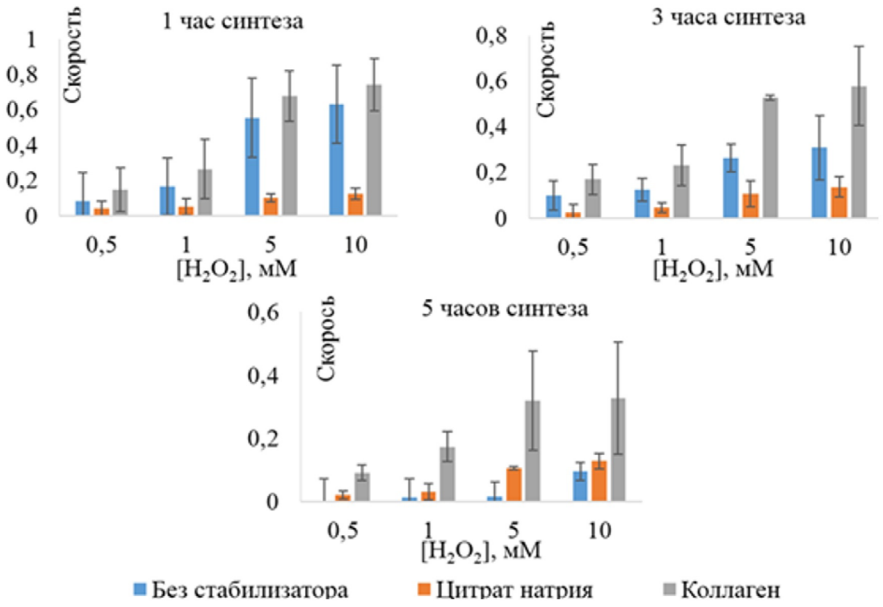
Аннотация

Исследовано влияние стабилизаторов цитрата натрия и коллагена на скорость взаимодействия наночастиц диоксида церия с пероксидом водорода.

Abstract

The effect of stabilizers sodium citrate and collagen on the rate of interaction of cerium dioxide nanoparticles with hydrogen peroxide was studied.

Наночастицы диоксида церия способны катализировать окислительно-восстановительные процессы, проявляя в биологических системах антиоксидантную активность подобно ферментам каталазе и супероксиддисмутазе [1]. Однако применение наночастиц диоксида церия в биомедицинской практике требует модификации поверхности для повышения агрегационной устойчивости в биологических системах. В связи с этим актуальным является поиск стабилизаторов поверхности нанодисперсного церия позволяющих сохранить, с одной стороны, каталитические свойства частицы и, с другой, агрегационную устойчивость коллоидной системы. В данной работе рассмотрено влияние стабилизаторов поверхности цитрата натрия и коллагена на способность наночастиц диоксида церия взаимодействовать с пероксидом водорода.



Скорость взаимодействия наночастиц диоксида церия, синтезированных за разное время, с пероксидом водорода

© В. В. Войнаровский, К. А. Кучмурадов, И. В. Мартинович, Г. Г. Мартинович, 2025

Синтез наночастиц проводили методом гомогенного осаждения, описанным в работе [2]. Для приготовления исходных растворов использовали гексагидрат нитрата церия ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$) и гексаметилентетрамин. Раствор гексагидрата нитрата церия в концентрации 10 мМ смешивали с раствором гексаметилентетрамина в концентрации 100 мМ и инкубировали при температуре 60 °С и постоянном перемешивании. Продолжительность синтеза составляла 1; 3 и 5 ч. Для функционализации поверхности использовали цитрат натрия и коллаген. Концентрации стабилизаторов составляла 5 мг/мл.

Наночастицы диоксида церия обладают характерным максимумом в ближней УФ-области спектра поглощения. При взаимодействии с пероксидом водорода в области максимума происходит изменение оптической плотности раствора наночастиц, скорость которого зависит от типа стабилизаторов. Для определения скорости взаимодействия пероксида водорода с наночастицами диоксида церия изучены кинетики изменения оптической плотности раствора наночастиц диоксида церия на длине волны 290 нм при добавлении различных концентраций пероксида водорода (см. рисунок).

Показано, что отсутствие стабилизатора приводит к потере каталитических свойств наночастиц при длительном синтезе, что, вероятно, связано с потерей агрегационной устойчивости. Наночастицы диоксида церия, стабилизированные цитратом натрия, проявляли наименьшие каталитические свойства, вероятно, из-за ограниченного контакта окислителя с поверхностью частицы. Коллаген обладает лучшими стабилизирующими свойствами, сохраняя каталитические свойства наночастиц диоксида церия при любом времени синтеза.

Литература

1. Das S., Dowding J. M., Klump K. E. et al. Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine // Nanomedicine. 2013. Vol. 8. P. 1483–1508.

2. Иванов В. К., Козик В. В., Шапорев А. С. и др. Синтез нанопорошков CeO_2 и ZnO с контролируемым размером частиц методом гомогенного гидролиза в присутствии гексаметилентетрамина // Химия в интересах устойчивого развития. 2011. Т. 19, № 3. С. 249–257.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-67

СУБСТРАТНАЯ МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ А2: ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ АКТИВНОСТИ ОТ СУБСТРАТА

SUBSTRATE MODULATION OF PHOSPHOLIPASE A2 ACTIVITY: ELUCIDATING ITS SUBSTRATE DEPENDENCE

В. В. Волков, В. В. Бессонов

ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва

V. V. Volkov, V. V. Bessonov

Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow

✉ vova.volkov.00@list.ru

Аннотация

Исследована активность фосфолипазы А2 (ФЛА2) методом потенциометрического титрования на фосфатидилхолине, соевом и яичном лецитине. Выявлена зависимость активности ФЛА2 от природы субстрата: фосфатидилхолин показал максимальную активность, соевый лецитин — минимальную. Обсуждены причины субстратной модуляции, намечены направления дальнейших исследований с учетом важности выбора субстрата для точного анализа активности ФЛА2.

Abstract

The activity of phospholipase A2 (PLA2) was investigated using potentiometric titration on phosphatidylcholine, soybean, and egg lecithin. A dependence of PLA2 activity on substrate nature was revealed: phosphatidylcholine showed maximum activity, while soybean lecithin exhibited the lowest. The reasons for substrate modulation were discussed, and directions for further research were outlined, emphasizing the importance of substrate selection for accurate PLA2 activity analysis.

Фосфолипазы — это семейство гидролитических ферментов, которые катализируют расщепление сложноэфирных связей в фосфолипидах [1, 2]. Их активность является критически важной для мембранного гомеостаза, синтеза и деградации липидов, а также для генерации широкого спектра биоактивных молекул, участвующих в клеточной сигнализации [3]. Существуют различные классы фосфолипаз (PLA1, PLA2, PLC, PLD), каждый из которых расщепляет определенную сложноэфирную связь в молекуле фосфолипида, генерируя уникальные продукты (например, лизофосфолипиды, жирные кислоты, диацилглицерол, фосфатидная кислота, инозитолфосфаты) [4–6]. В настоящем исследовании изучена субстратная специфичность фосфолипазы А2 с использованием трех различных фосфолипидных субстратов: соевого лецитина, чистого фосфатидилхолина и лецитина из куриных яиц. Определение активности фосфолипазы А2 производилось методом потенциометрического титрования с использованием pH-электрода компании Metrohm. Титрование осуществлялось стандартным раствором NaOH известной концентрации — 0,05Н, позволяющим фиксировать изменение pH по мере нейтрализации продуктов ферментативной реакции. Реакцию проводили при температуре 38 °С и pH 7,0, оптимальных для работы фермента в течение 25 мин. Точку эквивалентности определяли графическим методом, строя кривую титрования — зависимость pH от объема добавленного титранта — и выявляя точку, соответствующую эквивалентной точке реакции. Для более точного определения активности фосфолипазы отбиралось 7 точек от начала титрования (проба без добавления фермента, спустя 3 мин работы фермента, 5, 10, 15, 20, 25 мин) (см. рисунок).

Значения гидролитической активности фосфолипазы U, мкмоль/(см^3 эмульсии×мин) и удельной активности фосфолипазы Ауд, U/г (см^3) были получены математически, путем вычисления двойных обратных координат и квадрата коэффициента корреляции R и построения линейного графика зависимости Y_n от X_n, описанных в ГОСТ 71137-2023. Результаты демонстрируют, что ферментативная активность фосфолипаз не является универсальной, а проявляет выраженную субстратную специфичность и зависит от химического состава и структуры субстрата. Наиболее высокую каталитическую активность фосфолипаза А2 проявила в отношении чистого фосфотидилхолина (60 ± 3 U/г), что указывает на оптимальное взаимодействие фермента с его компонентами. Активность фермента была существенно ниже с лецитином из яиц (50 ± 3 U/г), а минимальная активность наблюдалась с соевым лецитином (40 ± 3 U/г). Такое различие в активности, возможно, обусловлено наличием в соевом лецитине и лецитине из яиц дополнительных липидных компонентов (например, других фосфолипидов,

© В. В. Волков, В. В. Бессонов, 2025

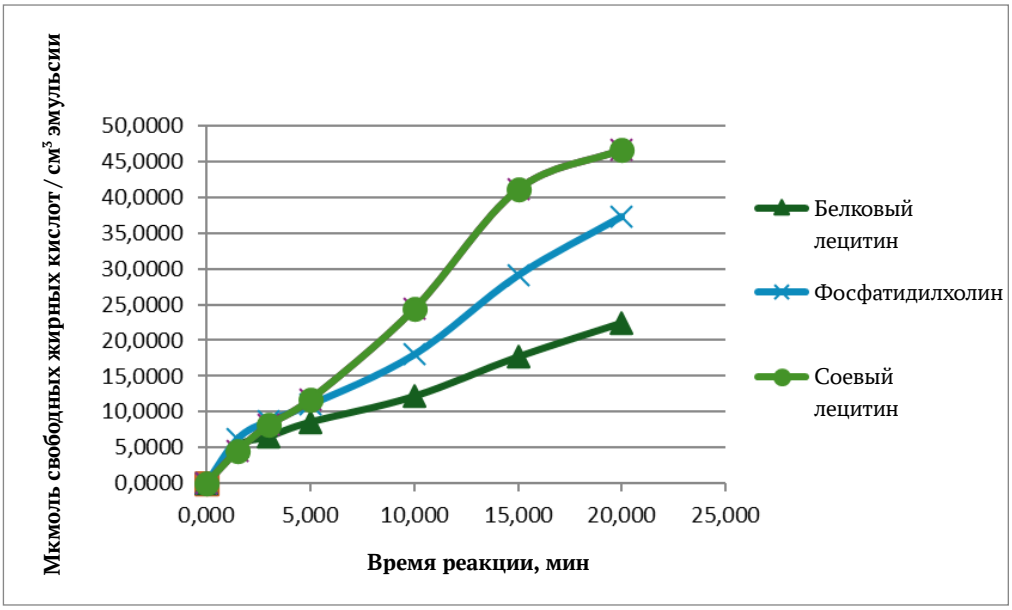


График нарастания содержания свободных жирных кислот
в зависимости от времени взаимодействия фермента с субстратом

жирных кислот или стеринов), способствующих менее эффективному связыванию с ферментом и/или изменению его конформации, что препятствует катализу. Различие в активности также может быть вызвано и чистотой анализируемой фосфолипазы, в которой могут присутствовать другие гидролазы, ингибиторы, или препарат может содержать большое количество посторонних белков. Все это может повлиять на ход анализа и приводить к неточным и неверным значениям активности. Данное исследование подтверждает важность тщательного выбора субстрата при изучении кинетики фосфолипазы А2 и подчеркивает выраженную субстратную модуляцию ее активности. Полученные данные являются основой для дальнейших, более глубоких исследований. Планируются работы по детализации механизма взаимодействия фосфолипазы А2 с различными фосфолипидами, включая структурный анализ формируемых мицелл, изучение влияния чистоты субстратов и их жирнокислотного профиля, оптимизацию методов определения активности с учетом выявленных субстратных особенностей, а также сравнительный анализ активности микробных, животных и растительных фосфолипаз А2 с целью выявления общих закономерностей и различий в их субстратной специфичности.

Литература

1. Камышников В. С. Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость исследований общей активности фосфолипазы А2 при формах мембранной патологии, сопровождающихся развитием воспалительно-деструктивных процессов в организме: учеб.-метод. пособие / Белорус. мед. акад. последиплом. образов. Минск: БелМАПО, 2021. 30 с.

2. Кацнельсон Е. И., Чиркин А. А. Клеточная биология: учеб.-метод. комплекс / Витеб. гос. ун-т им. П. М. Машерова. Витебск: ВГУ им. П. М. Машерова, 2021.

3. Das U. N. Cell membrane theory of senescence and the role of bioactive lipids in aging, associated diseases and their therapeutic implications // Biomolecules. 2021. Vol. 11. P. 241.

4. Balboa M. A., Balsinde J. Phospholipases: from structure to biological function // Biomolecules. 2021. Vol. 11. P. 428.

5. Murakami M., Sato M., Taketomi Y. Updating phospholipase A2 biology // Biomolecules. 2020. Vol. 10. P. 1457.

6. Меркульева Ю. А., Чиркова В. Ю., Шарлаева Е. А., Щербаков Д. Н. Фосфолипазы С бактерий рода Bacillus: биологическая роль, свойства и области применения // Биоорганическая химия. 2021. Т. 47, вып. 4. С. 464–471.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-68

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ АКНЕ

CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY FOR CULTURING BACTERIOPHAGES PROMISING FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF ACNE

А. А. Воробьева[1], Е. С. Зубкова[1], А. М. Воробьев[1], М. А. Пасивкина[1], И. А. Киселева[1], А. Т. Запевалов[1], М. Н. Анурова[2], А. Н. Блинцов[3], Д. Л. Исаев[3], А. В. Алешкин[4]

[1]Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
[3]ООО «Натура Сиберика», Москва
[4]ООО «Орфан-Био», Сочи

A. A. Vorobeva[1], E. S. Zubkova[1], A. M. Vorobev[1], M. A. Pasivkina[1], I. A. Kiseleva[1], A. T. Zapevalov[1], M. N. Anurova[2], A. N. Blintsov[3], D. L. Isaev[3], A. V. Aleshkin[4]

[1]G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology
[2]I. M. Sechenov First Moscow State Medical University
[3]Natura Siberica LLC, Moscow
[4]Orphan-Bio LLC, Sochi

✉ a-nastya@yandex.ru

Аннотация

Акне — воспалительное заболевание кожи, ассоциированное с чрезмерным ростом бактерий *Cutibacterium acnes*. Частое и неконтролируемое применение противомикробных средств при акне ведет к распространению антибиотикорезистентности и усугублению заболевания. Бактериофаги, активные в отношении резистентных *C. acnes*, могут стать эффективной альтернативой в терапии акне.

Abstract

Acne is an inflammatory skin disease associated with the overgrowth of *Cutibacterium acnes* bacteria. Frequent and uncontrolled use of antimicrobial agents for acne leads to the spread of antibiotic resistance and aggravation of the disease. Bacteriophages active against resistant *C. acnes* may become an effective alternative in acne therapy

Проблема акне остается одной из наиболее актуальных в современной дерматологии. Частота встречаемости заболевания у взрослого населения составляет 25 %, в то время как у подростков — 85 % [1]. Основным патогенетическим фактором акне является анаэробная бактерия *C. acnes,* которая играет основную роль в развитии воспалительного процесса в сально-волосяных фолликулах. Стандартные методы лечения акне предполагают использование противовоспалительных средств и антибактериальных препаратов, которые приводят к возникновению многочисленных нежелательных реакций и побочных явлений. Ключевой проблемой является развитие антибиотикорезистентности микроорганизмов при неконтролируемом использовании антибиотиков, вследствие чего традиционная терапия становится неэффективной.

Применение бактериофагов является перспективным решением в борьбе с акне ввиду их высокой специфичности, способности действовать на антибиотикорезистентные штаммы, отсутствия побочных эффектов.

Целью данного исследования является разработка технологии культивирования бактериофагов и создание эффективных фаговых лечебно-профилактических продуктов в форме геля и крема для терапии и профилактики акне.

В ходе исследования у пациентов с диагнозом «акне» были выделены 25 штаммов *C. acnes* — основного бактериального этиологического агента акне — и два литических бактериофага NS-ph1 и NS-ph2, проявляющих специфическую литическую активность в отношении данных штаммов. Выделение чистых линий бактерий и бактериофагов осуществлялась из клинического материала, взятого с поверхности воспалительных элементов кожи.

Подтвержден 100%-й спектр литической активности выделенных бактериофагов в отношении изучаемых штаммов. С помощью биоинформатического анализа было определено таксономическое положение бактериофа-

© А. А. Воробьева, Е. С. Зубкова, А. М. Воробьев, М. А. Пасивкина, И. А. Киселева, А. Т. Запевалов, М. Н. Анурова, А. Н. Блинцов, Д. Л. Исаев, А. В. Алешкин, 2025

гов (класс *Caudoviricetes*, род *Pahexavirus*), подтверждена их вирулентная природа, выявлено отсутствие нежелательных генов (интеграз, антибиотикорезистентности и т. д.).

Была определена физико-химическая стабильность бактериофагов на протяжении 6 месяцев: устойчивы при pH 5,5–7,5, температурах от −80 до +25 °C. Не инактивируется при воздействии хлороформа.

Определены оптимальные параметры культивирования выделенных бактериофагов, обеспечивающие получение фаголизата с высоким титром вирусных частиц: глубинное культивирование штамма-хозяина в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой с добавлением 1 % дрожжевого экстракта, 1 % глюкозы, 1 % сахарозы и 1 % лактозы; заражение бактериальных клеток при достижении логарифмической фазы роста при MOI = 0,01–0,1. Титр бактериофагов в вирусном сборе, полученном по данной технологии через 8–12 ч после заражения, достигал 10^9 БОЕ/мл. Затем с помощью глубинной фильтрации (фильтр с мембраной из полиэфирсульфона и диаметром пор 0,2 мкм; скорость потока 120 мл/мин, давление не более 1,0 бар) проводилась очистка фаголизата от клеточного дебриса и неразрушенных клеток. С целью дальнейшей очистки от остаточных белков и ДНК культуры клеток, а также от белков питательной среды проводили ультрафильтрацию в тангенциальном потоке (кассета с мембраной из полиэфирсульфона и пределом отсечения 100 кДа, давление на входе не более 1,0 бар, скорость потока 250 мл/мин) с последующей финальной стерилизующей фильтрацией. В результате многоступенчатой технологии культивирования и очистки фаголизата концентрация вирусных частиц составила 10^{10} БОЕ/мл. Таким образом, полученный очищенный фаголизат может быть применен в качестве активной субстанции в антибактериальных средствах для местного применения от акне.

Также в ходе исследования была проведена комплексная оценка совместимости бактериофагов NS-ph1 и NS-ph2 с 40 вспомогательными веществами, необходимыми для разработки косметического средства с лечебно-профилактическим эффектом. После хранения на протяжении 6 месяцев при +4 °C было определено 16 совместимых компонентов, не влияющих на литическую активность бактериофагов. На основе этих данных разработаны стабильные композиции в форме геля (на основе альгината натрия и целлюлозной камеди) и крема (с гидрогенизированным лецитином), сохраняющие литическую активность бактериофагов при хранении в холодильнике в течение полугода.

Полученные результаты могут стать научной основой для разработки инновационных эффективных и безопасных продуктов против акне в качестве альтернативы существующим антибактериальным средствам.

Литература

1. Lynn D. D., Umari T., Dunnick C. A., Dellavalle R. P. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence // Adolescent health, medicine and therapeutics. 2016. Vol. 7. P. 13–25.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-69

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТЫХ СОРБЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ ГЛИНИСТЫХ МИНЕРАЛОВ*

DEVELOPMENT OF EFFECTIVE AND ENVIRONMENTALLY FRIENDLY ANTIBIOTIC SORBENTS BASED ON CLAY MINERALS

М. М. Герцен, Л. В. Переломов

Тульский государственный педагогический университет им. Л. Н. Толстого

M. M. Gertsen, L. V. Perelomov

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University

✉ mani.gertsen@gmail.com

Аннотация

Изучена адсорбция окситетрациклина бентонитом и каолинитом. Установлено, что модель Ленгмюра и модель Фрейндлиха по коэффициентам корреляции адекватно применимы для описания процесса сорбции данного антибиотика ($R \geqslant 0{,}98$). Предельная адсорбция для бентонита составляет 406,8 ± 0,05 мг·г$^{-1}$, а для каолинита — 0,19 ± 0,05 мг·г$^{-1}$. Биосенсорным методом доказано отсутствие токсичности исследуемых глинистых минералов по отношению к люминесцентным бактериям.

Abstract

The study investigated the adsorption of oxytetracycline on bentonite and kaolinite. It was found that both the Langmuir and Freundlich models were adequately applicable to describe the sorption process based on correlation coefficients ($R \geqslant 0.98$). For bentonite, the limiting adsorption was 406.8 ± 0.05 mg/g, and for kaolinite, it was 0.19 ± 0.05 mg/g. The biosensor method confirmed the absence of toxicity of these clay minerals towards luminescent bacteria.

Высокая стабильность окситетрациклина делает его устойчивым к деградации, что может привести к потенциальному загрязнению окружающей среды. Основными источниками накопления окситетрациклина в водной и почвенной среде являются сельскохозяйственные и фармацевтические предприятия, а также осадки сточных вод [1]. Высокие концентрации данного антибиотика могут представлять угрозу как для экосистем, так и для здоровья человека. Поэтому изучение экологического поведения окситетрациклина в водных и почвенных условиях является актуальной задачей. Глинистые минералы обладают коллоидной структурой, малым размером частиц, высокой удельной поверхностью и собственным электрическим зарядом, что делает их перспективными сорбентами для органотоксикантов, таких как антибиотики [2]. Целью исследования являлось изучение адсорбции окситетрациклина глинистыми минералами (бентонита и каолинита) и оценка их токсического действия по отношению к люминесцентным бактериям. В работе использовали каолинит мокрой обработки (ОАО «Веско», Донецкая область). Состав оксидов: Al_2O_3 — 31,92 %, Fe_2O_3 — 0,91 %, TiO_2 — 1,59 %. Удельная поверхность по метиленовому синему — 12 м^2/г. Моноионная натриевая форма бентонита (BentoGroupMinerals, Москва). Состав оксидов: SiO_2 — 58,3 %, Al_2O_3 — 14,3 %, Fe_2O_3 — 4,4 %, MgO — 3,6 %, Na_2O — 2,3 %, K_2O — 1,2 %, CaO — 2,1 %. Емкость катионного обмена минерала — 105 мг-экв/100 г. Рабочие концентрации антибиотика для анализа сорбционной емкости сорбента: 0,3–15 ммоль/л. Содержание окситетрациклина определяли методом ВЭЖХ [3]. Полученные данные аппроксимировали моделью Ленгмюра и Фрейндлиха (см. таблицу).

Высокие коэффициенты детерминации свидетельствуют о том, что данные модели подходят для описания процесса сорбции окситетрациклина бентонитовыми и каолинитовыми глинами. Значение константы Ленгмюра для бентонита составляет 0,0068 ± 0,0003 л·мг$^{-1}$, а для каолинита — 0,0004 ± 0,00002 л·мг$^{-1}$. Эти значения указывают на прочную связь антибиотика с сорбирующей поверхностью обеих глин. Расчетное предельное значение адсорбции для бентонита составляет 406,8 ± 0,05 мг·г$^{-1}$, а для каолинита — 0,19 ± 0,05 мг·г$^{-1}$. Параметр $K_ф$, характеризующий емкость сорбента, имеет максимальное значение: 11,41 л·мг$^{-1}$ для бентонита и 0,19 л·мг$^{-}$1 для каолинита. Безразмерный параметр $1/n$ позволяет оценить энергетическую неоднородность реакционных центров на сорбирующей поверхности и составляет 0,56 для бентонита и 0,88 для каолинита. Полученные значения свидетельствуют об относительно однородной поверхности сорбента для поглощения антибиотиков.

* Исследование выполнено в рамках проекта Российского научного фонда № 25-17-20037, проводимого совместно с органами власти субъекта Российской Федерации (Тульская область).

© М. М. Герцен, Л. В. Переломов, 2025

Параметры адсорбции тетрациклина глинистыми минералами

Модель Ленгмюра			
Сорбент	R	A_{∞}, мг/г	$K_{Л}$, л/мг
Бентонит	0,98	406,8	0,0068
Каолинит	0,99	334,4	0,0004
Модель Фрейндлиха			
Сорбент	R	$K_{ф}$, л/мг	1/n
Бентонит	0,99	11,41	0,5612
Каолинит	0,98	0,19	0,8813

Для анализируемых глин были последовательно проведены измерения на токсичность водных вытяжек (соотношение твердой и жидкой фазы 1 : 10) из трех пар образцов («контрольный/экспериментальный») биосенсором тест-системы «Эколюм» [4]. Токсичность образца оценивали по относительной разнице в интенсивности биолюминесценции контрольного и экспериментального образцов и расчету индекса токсичности (Т) по формуле

$$T = \frac{I_{к} - I_{О}}{I_{k}} \cdot 100\%,$$

где $I_{к}$ — интенсивность люминесценции контрольного образца бактерий, $I_{о}$ — интенсивность люминесценции бактерий после добавления водной вытяжки исследуемого образца. При индексе токсичности свыше 20 % образец считают токсичным, 50 % — высокотоксичным. Установлено, что ни бентонит (*T,* % = 0), ни каолинит (*T*, % = 0) не обладают токсичностью по отношению к люминесцентным бактериям и могут использоваться в качестве экологически чистых сорбентов антибиотиков.

Литература

1. Harja M., Ciobanu G. Studies on adsorption of oxytetracycline from aqueous solutions onto hydroxyapatite // Science of The Total Environment. 2018. Vol. 628–629. P. 36–43.

2. Perelomov L., Gertsen M., Mandzhieva S. et al. Adsorption of Antibiotics by Natural Clay Minerals // Minerals. 2025. Vol. 15 (7). P. 733.

3. Thiele-Bruhn S., Seibicke T., Schulten R.-H., Leinweber P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions // Journal of Environmental Quality. 2004. Vol. 33 (4). P. 1331–1342.

4. Kharkova A., Arlyapov V., Medvedeva A. et al. Mediator Microbial Biosensor Analyzers for Rapid Determination of Surface Water Toxicity // Sensors. 2022. Vol. 22 (21). P. 8522.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-70

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КОНСТРУКЦИЯХ, СОЗДАННЫХ ПУТЕМ БИОПРИНТИНГА *

DEVELOPMENT OF OPTIMAL CONDITIONS FOR USE IN BIOPRINTED CONSTRUCTS

Э. Т. Дегирменджи, К. А. Юрченко, Н. А. Волкова, Ю. С. Саенко

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь

E. T. Degirmendzhi, K. A. Yurchenko, N. A. Volkova, Yu. S. Saenko

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol

✉ degirmenjievelina@yandex.ru

Аннотация

В настоящее время мировые достижения молекулярно-клеточной биологии создали основу для применения клеточных технологий при лечении длительных раневых дефектов. Используется введение в рану аутологических и аллогенных фибробластов, что значительно укорачивает сроки заживления. Цель данного исследования — разработать оптимальные условия культивирования первичных фибробластов для использования в конструкциях, созданных путем биопринтинга.

Abstract

Currently, global achievements in molecular cell biology have created the basis for the use of cellular technologies in the treatment of long-term wound defects. The introduction of autologous and allogenic fibroblasts into the wound is used, which significantly shortens the healing time. The purpose of this study is to develop optimal conditions for culturing primary fibroblasts for use in structures created by bioprinting.

Принимая во внимание опыт клиницистов, следует отметить, что до сих пор не выработана единая концепция в тактике лечения кожных дефектов с применением аутологичных фибробластов в комплексе с различными биодеградируемыми скаффолдами. Недостаточная изученность данного вопроса, отсутствие данных о способе применения, показаниях и противопоказаниях для трансплантации клеточных культур и ряд других нерешенных вопросов ограничивают возможность широкого использования данного метода.

При добавлении фибробластов в структуру скаффолда их жизнеспособность резко падает, а при нанесении скаффолда на поврежденную поверхность активность клеток быстро угасает. В связи с этим создание технологий, позволяющих получить более устойчивую культуру клеток, которые можно внедрить в структуру подложки для дальнейшего использования, остается актуальным.

Технология культивирования фибробластов человека из биоптатов кожи в коллагеновой матрице включает в себя выделение, культивирование фибробластов, высевание фибробластов, оценку их жизнеспособности и способности к размножению в коллагеновой матрице. Дальнейшие исследования по созданию прототипа представляют собой моделирование трансплантации фибробластов в 3-мерном коллагеновом матриксе и включают: подготовку коллагеновой матрицы, высевание фибробластов, оценку их жизнеспособности и способности к размножению, оценку морфологии и взаимодействия с коллагеновой матрицей.

Установлено, что полученные с помощью разработанной технологии культивирования фибробласты сохраняют жизнеспособность в коллагеновом матриксе и при этом происходит их дальнейшее размножение. Проведены эксперименты по моделированию трансплантации фибробластов в 3-мерном коллагеновом матриксе. Эксперименты показали эффективность приживления трансплантированных фибробластов, которые возобновляют свою активную пролиферацию в условиях культуры.

* Исследование выполнено при поддержке ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» в рамках проекта МОЛ/2024/3.
© Э. Т. Дегирменджи, К. А. Юрченко, Н. А. Волкова, Ю. С. Саенко, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-71

IN SILICO И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛА ПЕПТИДООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ БЕЛКОВ РАПСА *

IN SILICO AND EXPERIMENTAL APPROACHES TO ASSESSING THE POTENTIAL OF PEPTIDE FORMATION DURING HYDROLYSIS OF RAPESEED PROTEINS

И. А. Дегтярев, И. А. Фоменко

Российский биотехнологический университет, Москва

I. A. Degtyarev, I. A. Fomenko

Russian Biotechnological University, Moscow

✉ Ivand152@yandex.ru

Аннотация

Одним из предметов современных исследований является получение и изучение свойств биологически активных пептидов (БАП). БАП возможно получить из природных источников, в частности из белков рапса (*Brassica napus*), путем направленного гидролиза белков с использованием ферментных препаратов. Современные биоинформационные методы исследования позволяют осуществить отбор пептидов в полученных гидролизатах на основе прогнозируемой биологической активности.

Abstract

One of the subjects of modern research is the production and study of the properties of biologically active peptides (BAP). BAP can be obtained from natural sources, from rapeseed (*Brassica napus*) proteins, by targeted hydrolysis of proteins using enzyme preparations. Modern bioinformatic research methods make it possible to select peptides in the obtained hydrolysates based on the predicted biological activity.

Целью данной работы являлась разработка технологии направленного протеолиза белков рапса с образованием пептидов и дальнейшим определением биологической активности методами *in silico,* а также сравнение результатов моделирования процесса теоретического гидролиза с использованием инструментов биоинформатики и определения их потенциальной активности.

Материалы и методы

Ферментативный гидролиз проводили с использованием ферментных препаратов (ФП) Alcalase 2.4 L FG (Novozymes A/S, Дания), Sqzyme PS (Suntaq International Limited, Китай) и Neutral protease (Sunson Industry Group Co, Китай) до степени гидролиза белка 10 %. Идентификацию пептидов в гидролизатах, полученных после ферментативной обработки, осуществляли методом жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS с использованием масс-спектрометра Orbitrap Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей сортировкой пептидов по убыванию по принципу соотношения площади пика пептида к суммарной площади пиков всех определенным данным способом пептидов (рис. 1–3).

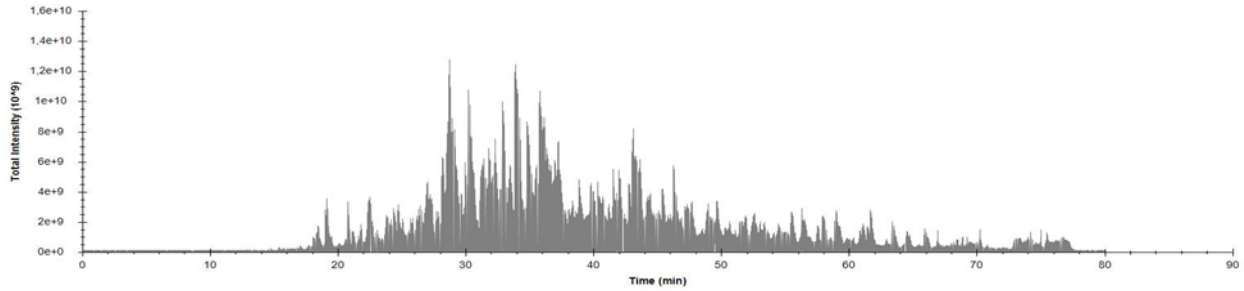


Рис. 1. Масс-спектры образца гидролизата белка рапса, полученного с использованием ФП Alcalase 2.4 L FG

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-16-00178).

© И. А. Дегтярев, И. А. Фоменко, 2025

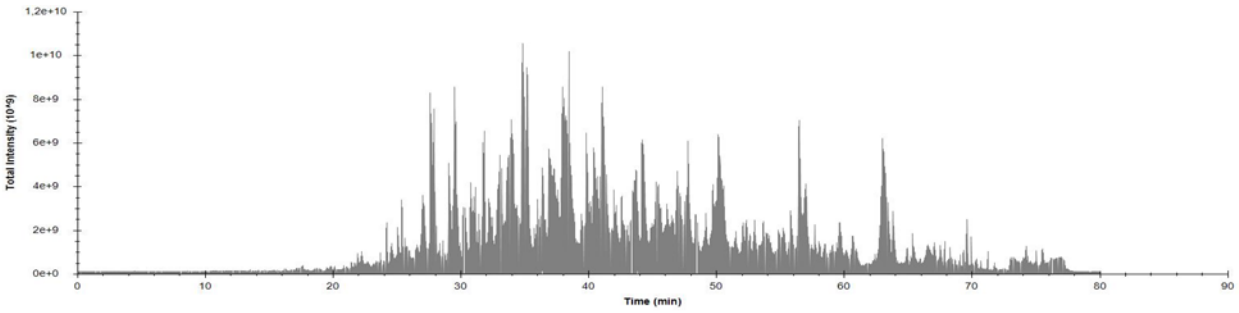


Рис. 2. Масс-спектры образца гидролизата белка рапса, полученного с использованием ФП Sqzyme PS

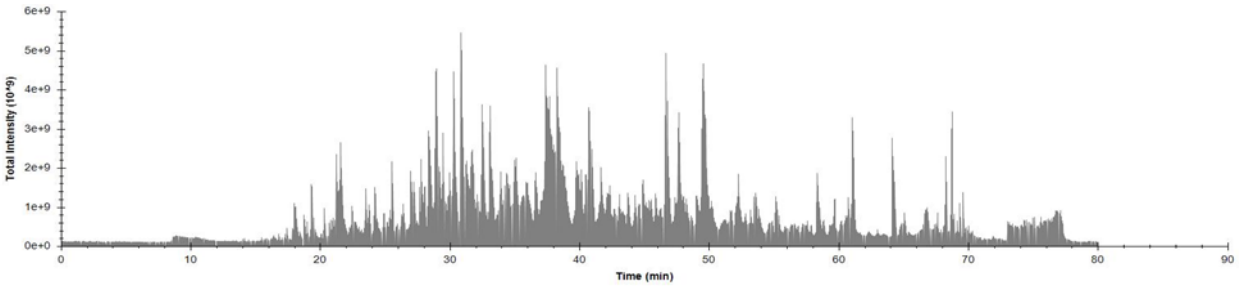


Рис. 3. Масс-спектры образца гидролизата белка рапса, полученного с использованием ФП Sunson neutral

В гидролизате, полученном с использованием ФП Alcalase 2.4 L FG, было определено 6667 пептидов, из которых отобраны 4 мажорных, в образце с ФП Sqzyme PS — 7678 пептидов, 3 из которых являются мажорными, а в образце с ФП Sunson neutral — 9034 пептида, из которых 6 являются мажорными. Отношение по площади под пиком для отсортированных пептидов составляло более 3 %. Далее провели прогнозирование *in silico* биологических активностей расшифрованных последовательностей мажорных пептидов с использованием инструментов баз данных BIOPEP-UWM, ToxinPred, AntiCP, AntiBP2, AHTpin и AntiTbPred. В результате было предсказано 13 пептидов со способностью ингибирования АПФ, противоопухолевой и гипогликемической активностями, 11 пептидов с потенциальными антиоксидантной и антигипертензивной активностями, 5 пептидов-ингибиторов α-глюкозидазы и 2 пептида с предполагаемыми антитромботическими свойствами.

Для проведения теоретического гидролиза аминокислотные последовательности белков рапса были получены в формате FASTA в базе данных UniProtKB. Поиск в данной БД был осуществлен на основе латинских наименований источников белков, а также по происхождению белка — Storage protein.

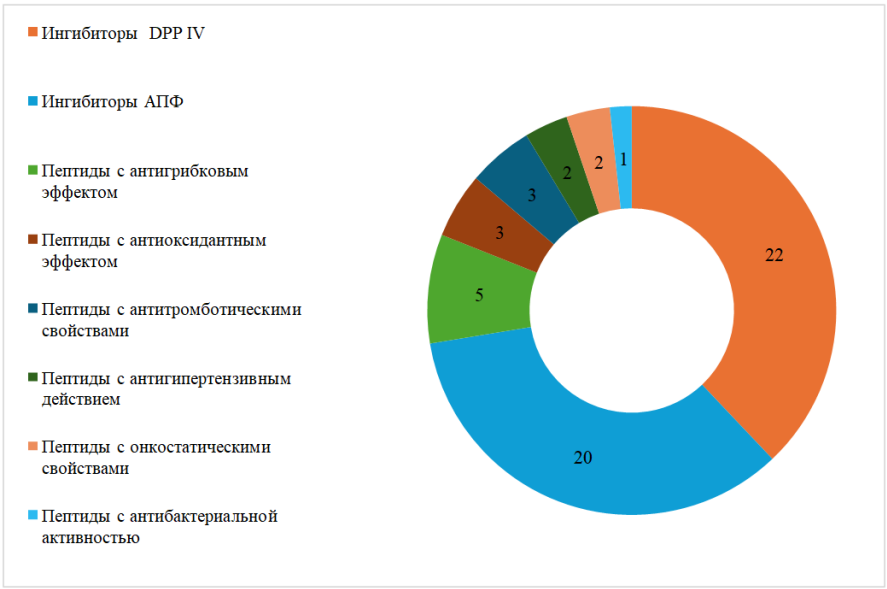


Рис. 4. Пептиды, полученные в результате исследования методом *in silico*

В рамках проекта РНФ № 25-16-00178 был проведен *in silico* протеолиз белков рапса с помощью инструмента Enzymes Action в базе данных BIOPEP-UWM с использованием ферментов пепсина, pH > 2,0 (EC 3.4.23.1), трипсина (EC 3.4.21.4), протеиназы K (EC.3.4.21.67), папаина (EC 3.4.22.2) и бромелаина (EC 3.4.22.32). Для дальнейших исследований были отобраны пептиды, обладающие потенциальной биологической активностью. На рис. 4 изображено количество пептидов и их потенциальная активность после проведения исследования *in silico*. Из представленных данных видно, что результаты экспериментальных исследований в высокой степени коррелируют с данными, полученными в ходе исследования *in silico*.

Биоинформатические методы, включая виртуальный гидролиз и алгоритмы предсказания биологической активности, представляют собой известный инструмент в исследовании пептидов. Они позволяют быстро и без материальных затрат выявлять потенциально биологически активные пептиды на основе последовательности белков-предшественников. Проблема заключается в том, что прогнозы, основанные на биоинформатических моделях, зачастую не в полной мере соответствуют данным, полученным в ходе *in vitro* и *in vivo* исследований. Согласно виртуальному гидролизу и алгоритмам предсказания, пептиды должны обладать определенной биологической активностью, но в реальности могут проявлять ее в меньшей степени, отличаться по характеру активности или даже оказаться неактивными. Причины расхождения между виртуальными предсказаниями и экспериментальными данными лежат в сложности биологических систем и неполноте знаний о механизмах действия пептидов. Дополнение биоинформатических моделей данными экспериментальных исследований позволит в полной мере реализовать потенциал этих методов и повысить надежность прогнозов биологической активности пептидов, что откроет новые возможности для направленной разработки БАП с заданными свойствами.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-72

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ *

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT PROTEINS OF PLANT VIRUSES

А. А. Десяткин[1], Н. В. Блажко[1], С. Х. Вышегуров[2], А. Ю. Величко[1]

[1]Научно-исследовательский центр «Инновации», Новосибирск
[2]Новосибирский государственный аграрный университет

A. A. Desyatkin[1], N. V. Blazhko[1], S. H. Vishegurov[2], A. Y. Velichko[1]

[1]Research Center "Innovations", Novosibirsk
[2]Novosibirsk State Agrarian University

✉ bnv@nic-innovations.ru

Аннотация

Для выявления вирусных заболеваний растений требуются быстрые и точные методы диагностики возбудителей. Одним из таких методов выявления фитопатогенов является иммунохимический. Ключевыми компонентами для разработки отечественных иммунохимических тест-систем являются рекомбинантные вирусные белки, сохраняющие структурные и функциональные свойства вирусных аналогов.

Abstract

Prevention of viral diseases requires fast and accurate methods for detecting viral pathogens. One of the fast and accurate methods for detecting plant viral pathogens is immunochemical methods. Key components for the development of domestic immunochemical test systems are recombinant viral proteins that retain the structural and functional properties of viral analogues.

В настоящее время большинство сельскохозяйственных культур находится под угрозой различных вирусов, вызывающих заболевания растений. Растительные вирусы наиболее часто представлены одно- и двухцепочечными РНК-вирусами, одноцепочечными и ретроидными ДНК-содержащими вирусами [1]. Такие вирусы состоят из молекулы нуклеиновой кислоты и защитной белковой оболочки (капсида) [2].

Вирусы вызывают множество экономически значимых заболеваний растений по всему миру. Заболевания растений в некоторых случаях могут приводить к потере урожайности до 98 %, а также снижению качества сельскохозяйственных культур [3, 4]. При этом отдельные представители вирусов растений способны инфицировать более 1000 разных видов растений из более 85 семейств [5].

Таким образом, профилактика вирусных заболеваний требует быстрых и точных методов обнаружения вирусных возбудителей. В настоящее время для диагностики заболеваний используют методы визуальной диагностики. Однако для точного определения заболеваний растений необходимо использовать иммунохимические методы и методы, основанные на ДНК- и РНК-технологиях [5].

Наиболее часто в иммунохимических методах используют моно-поликлональные препараты антител животного происхождения, полученные после иммунизации вирусным препаратом. Однако получение и работа с вирусными препаратами могут быть отягощены возможностью кросс-контаминации родственным вирусом, что может сказаться на специфичности полученных антител.

Поэтому целью нашей работы было получение функциональных рекомбинантных антигенов таких вирусов растений, как CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*), PepMV (*Pepino mosaic virus*), ToBRFV (*Tomato brown rugose fruit virus*), TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), которые в дальнейшем можно будет использовать для разработки отечественных диагностических систем вирусов растений.

Для этого были отобраны листья зараженных растений, из которых выделяли РНК (CGMMV, PepMV, ToBRFV) и ДНК (TYLCV). Генетический материал выделяли при помощи TRIzoll (Thermo Fisher Scientific, США), с последующим проведением ОТ-ПЦР/ПЦР для амплификации гена, кодирующего капсидный белок. В олигонуклеотиды для амплификации были добавлены уникальные сайты эндонуклеаз рестрикции BamHI и CciNI (СибЭнзим, Россия). В качестве вектора была использована экспрессионная плазмида системы pET. Кло-

* Исследование выполнено за счет средств областного бюджета Новосибирской области. Субсидия субъекту инновационной деятельности на финансовое обеспечение затрат в связи с выполнением работ по подготовке, осуществлению трансфера и коммерциализации технологий, включая выпуск опытной партии продукции, ее сертификацию, модернизацию производства и прочие мероприятия (000000540695998245120822/№Т-56).

© А. А. Десяткин, Н. В. Блажко, С. Х. Вышегуров, А. Ю. Величко, 2025

нирование генов, кодирующих капсидные белки в состав экспрессионного вектора, проводилось при помощи уникальных сайтов рестрикции по общепринятым методикам и рекомендациям производителя «СибЭнзим». Целостность рамки считывания определяли при помощи секвенирования по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск).

Рекомбинантные белки нарабатывали в бактериях *E. coli* штамма BL21(DE3) с добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ и культивированием в течение 16 ч. Очистку белков проводили с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Helthcare). Контроль целевых белков проводили при помощи электрофоретического разделения белков в денатурирующих условиях в 12%-м полиакриламидном геле по методу Лэмлли [6]. Выход целевого белка с 1 л культуры составлял более 50 мг с чистотой не менее 90 %. Оценку функциональности рекомбинантных белков осуществляли при помощи коммерческих наборов Agdia (США). В результате оценки коммерческие системы способны выявлять рекомбинантные белки в растворе в количестве менее 1 мкл/мл.

В результате были получены рекомбинантные белки, которые можно использовать для иммунизации животных и получения в дальнейшем конъюгатов антител, для производства отечественной тест-системы для выявления вирусов растений.

Литература

1. Koonin E. V., Senkevich T. G., Dolja V. V. The ancient Virus World and evolution of cells // Biology Direct. 2006. Vol. 1. P. 1–29.

2. Gergerich R. C., Dolja V. V. Introduction to plant viruses, the invisible foe // The Plant Health Instructor. 2006. Vol. 478.

3. Pennazio S., Roggero P., Conti M. Yield losses in virus infected crops // Phytopathology and Plant Protection. 1996. Vol. 30, No. 4. P. 283–296.

4. Czosnek H., Laterrot H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses // Archives of Virology. 1997. Vol. 142, No. 7. P. 1391–1406.

5. Nazarov P. A., Baleev D. N., Ivanova M. I. et al. Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection // Acta Naturae. 2020. Vol. 12, No. 3. P. 46–59.

6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-73

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДОСТАВКИ БАКТЕРИОФАГОВ *

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN-BASED HYDROGELS FOR BACTERIOPHAGE DELIVERY

С. П. Долина[1,2], И. А. Мальбахова[2], Т. А. Ушакова[2], В. В. Морозова[2], Н. В. Тикунова[1,2], Е. В. Дмитриенко[1,2]

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

S. P. Dolina[1,2], I. A. Malbakhova[2], T. A. Ushakova[2], V. V. Morozova[2], N. V. Tikunova[1,2], E. V. Dmitrienko[1,2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ s.dolina@g.nsu.ru

Аннотация

Работа посвящена решению проблемы лечения ран, осложненных бактериальными инфекциями, вызванными антибиотикорезистентными штаммами. В качестве альтернативы антибиотикам предложено применение бактериофагов, избирательно лизирующих целевые патогены. Предложены методики синтеза гидрогелей на основе HAS, загруженных бактериофагом PM16, методом термоиндуцированного гелеобразования.

Abstract

The work is devoted to solving the problem of treating wounds complicated by bacterial infections caused by antibiotic-resistant strains. As an alternative to antibiotics, the use of bacteriophages that selectively lyse target pathogens is proposed. Methods for synthesizing HSA-based hydrogels loaded with PM16 bacteriophage by the method of thermally induced gelation are proposed.

Постоянный рост антибиотикорезистентных инфекций повысил интерес к бактериофаговой (фаговой) терапии благодаря способности фагов уничтожать бактерии независимо от их резистентности [1]. Для эффективного применения фагов в медицинских приложениях их необходимо доставить в область инфицирования, обеспечить контролируемое высвобождение и стабильность фагов [1, 2]. Одним из наиболее перспективных носителей для локальной фаготерапии инфицированных ран являются гидрогели и изделия на их основе. Гидрогели на основе сывороточного альбумина человека (HSA) являются перспективной платформой для загрузки и доставки лекарств. Материалы на основе сывороточного альбумина человека являются биоразлагаемыми, биосовместимыми, обладают высокой эффективностью связывания со многими биомолекулами. В настоящей работе в качестве загружаемых в гидрогели терапевтических агентов использовали бактериофаги.

Синтез гидрогелей был осуществлен методом термоиндуцированного гелеобразования с использованием этилового спирта в качестве денатурирующего агента. Методом динамического светорассеивания был показан механизм гелеобразования и подтверждено получение истинного геля. Были охарактеризованы реологические и тиксотропные свойства полученных гелей. Показано возвращение структуры геля после лиофильной сушки и ресуспендирования криотекстурата. Бактериофаг PM16 был загружен в гели различными способами. Методом титрования в образцах гидрогеля установлена стабильность бактериофага PM16 в гидрогелях в зависимости от способа его введения. Показана высокая выживаемость бактериофага в условиях лиофильной сушки раствора PBS и HSA, а также гидрогеля. Продемонстрирована возможность хранения полученных растворов и геля, содержащих данный бактериофаг, без потери терапевтического титра в течение месяца при температурах 4; 25 и 37 °C. Продемонстрировано, что гидрогели на основе ЧСА, содержащие бактериофаг PM16, обладают выраженным антимикробным эффектом на *Proteus mirabilis*, что может быть использовано для создания противомикробных повязок.

Литература

1. Morozova V. V., Vlassov V. V., Tikunova N. V. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. P. 1696.

2. Chang R. Y. K., Morales S., Okamoto Y., Chan H. K. Topical application of bacteriophages for treatment of wound infections // Translational Research. 2020. Vol. 220. P. 153–166.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-64-00030).

© С. П. Долина, И. А. Мальбахова, Т. А. Ушакова, В. В. Морозова, Н. В. Тикунова, Е. В. Дмитриенко, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-74

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С АНТИМИКРОБНЫМ ПЕПТИДОМ CHBAC3.4

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE CHBAC3.4

А. Ю. Евстратова[1], Е. Я. Минаев[1], Н. С. Шастина[1], О. А. Баранова[2], А. В. Чеканов[2], Д. В. Товпеко[3], А. С. Комлев[4], М. С. Сухарева[4], Е. В. Владимирова[4], Э. Ю. Соловьева[2], А. И. Федин[2], В. А. Щелконогов[1,2]

[1]МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва
[3]Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург
[4]Институт экстремальной медицины, Санкт-Петербург

A. Yu. Evstratova[1], E. Ya. Minaev[1], N. S. Shastina[1], O. A. Baranova[2], A. V. Chekanov[2], D. V. Tovpeko[3], A. S. Komlev[4], M. S. Sukhareva[4], E. V. Vladimirova[4], E. Yu. Solovyeva[2], A. I. Fedin[2], V. A. Shchelkonogov[1,2]

[1]MIREA — Russian Technological University, Moscow
[2]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[3]S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg
[4]Institute of Extreme Medicine, Saint Petersburg

E-mail: evstratova.anastasya.8@yandex.ru

Аннотация

Получены липосомы (Лс) с антимикробным пептидом ChBac3.4, с размером частиц в диапазоне 140–210 нм, характеризующиеся высокой степенью включения в наночастицы (НЧ) независимо от pH среды и дисперсионной стабильностью при длительном хранении при T +4 °C. Продемонстрировано, что Лс с ChBac3.4 обладают выраженными антиоксидантными свойствами.

Abstract

Liposomes (Lc) with antimicrobial peptide ChBac3.4, with a particle size of 140–210 nm were obtained, characterized by a high encapsulation efficiency in nanoparticles (NPs) regardless of the pH of the medium and dispersion stability during long-term storage at T +4 °C. It has been demonstrated that Lc with ChBac3.4 have pronounced antioxidant properties.

Сосудистые заболевания головного мозга являются серьезными и распространенными патологиями центральной нервной системы, часто приводящими к летальным исходам. Ишемический процесс — ключевой фактор протекания многих патологических реакций в головном мозге. В основе таких биохимических реакций лежит «оксидативный стресс». Оксидативный стресс характеризуется чрезмерным образованием активных форм кислорода (АФК) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к повреждению и гибели нейронов головного мозга. Таким образом, при комплексной терапии данной патологии важно использовать препараты, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Антимикробный пептид (АМП) ChBac3.4 представляет собой богатый пролином и аргинином пептид, который обладает широким спектром биологических свойств от бактерицидного действия до участия в процессах регенерации. Однако при систематическом введении ChBac3.4 возникает ряд проблем, таких как высокая цитотоксичность, нежелательные побочные эффекты и быстрая биодеградация в организме.

Поэтому **целью исследования** является получение липосом с антимикробным пептидом ChBac3.4 для защиты его от биодеградации, пролонгированного действия, а также исследование биологической активности на модельных системах.

Первоначально получали фосфатидилхолиновые (ФХ) липосомы с ChBac3.4 методом гидратации липидной пленки, диспергируя ее фосфатным буферным (ФБР, pH 7,4) или физиологическим (pH 5,7) растворами, содержащими пептид, с последующей экструзией.

Таким образом были получены ФХ-липосомы с ChBac3.4 с размером частиц в диапазоне от 140 до 210 нм. Степень включения активной субстанции в Лс варьировалась от 60 до 95 % в зависимости от концентрации активной субстанции (0,3–0,6 мг/мл). Необходимо отметить, что эффективность включения АМП в Лс не зависела от pH среды. Было показано, что НЧ с ChBac3.4 были гомогенными, электронейтральными и дисперсионно ста-

© А. Ю. Евстратова, Е. Я. Минаев, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, Д. В. Товпеко, А. С. Комлев, М. С. Сухарева, Е. В. Владимирова, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, В. А. Щелконогов, 2025

бильными при длительном хранении (более 10 мес.) при Т +4 °С. Также было обнаружено, что за 3 дня высвободилось около 60 ± 10 % ChBac3.4 из наночастиц, что позволяет судить о пролонгированном действии.

Для оценки антиоксидантной активности Лс с ChBac3.4 был проведен тест с использованием стабильного DPPH-радикала. При добавлении Лс с ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) наблюдалось выраженное снижение концентрации DPPH-радикала, свидетельствующее о его восстановлении. В ходе эксперимента было установлено, что Лс с ChBac3.4 обеспечивали ингибирование DPPH-радикала в пределах 64–72 %, что указывает на выраженные антиоксидантные свойства данных липосом с АМП. Стоит отметить, что «пустые» Лс и водные растворы ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) также обладают антиоксидантным эффектом (ингибирование DPPH-радикала — 46–56 %).

Одними из форменных элементов крови являются нейтрофилы, способные генерировать активные формы кислорода (АФК) в присутствии различных активаторов или при воспалительных процессах. В данной работе оценивалось антиоксидантное действие липосом с ChBac3.4 на активированных нейтрофилах в сравнении с водным раствором пептида и «пустых» Лс. Активацию нейтрофилов обуславливали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА).

В результате проведенных исследований было показано, что добавление ФМА к нативным нейтрофилам (контроль) приводило к увеличению интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов по сравнению с интактными клетками. Добавление Лс с ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) приводило к значительному уменьшению (примерно 6–32 раза) интенсивности хемилюминесценции, обусловленной протеканием свободно-радикальных процессов в нейтрофилах, активированных с помощью ФМА, по сравнению с контролем. Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали Лс с ChBac3.4 при использовании максимально исследуемой концентрации пептида. Водный раствор ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) и «пустые» липосомы также проявляли антиоксидантные свойства в выбранной клеточной модели, снижая концентрацию АФК примерно в 2 раза.

Таким образом, липосомы с ChBac3.4 являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vitro*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-75

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ БЕЛКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ *

BIOSYNTHETIC PROTEIN NANOPARTICLES AS A TOOL FOR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION

И. Е. Егорова[1], Д. Д. Наместникова[2], А. А. Дресвянникова[1,2], В. А. Саркисова[3,4], Н. А. Александрушкина[4], П. И. Никитин[1], А. Н. Габашвили[1]

[1] *Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*
[3] *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*
[4] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

I. E. Egorova[1], D. D. Namestnikova[2], A. A. Dresvyannikova[1,2], V. A. Sarkisova[3,4], N. A. Aleksandrushkina[4], P. I. Nikitin[1], A. N. Gabashvili[1]

[1] *Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[3] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*
[4] *Lomonosov Moscow State University*

✉ irina.evgenievna.egorova@yandex.ru

Аннотация

При объединении подходов генетической и химической инженерии были созданы новые биосинтетические многофункциональные капсидоподобные белковые наночастицы для долгосрочного отслеживания клеток и направленной доставки препаратов.

Abstract

By combining genetic and chemical engineering approaches, new biosynthetic multifunctional capsid-like protein nanoparticles were obtained for long-term cells tracking and targeted drug delivery.

Бактериальные нанокомпартменты — белковые высокомолекулярные капсидоподобные икосаэдрические комплексы, состоящие из оболочки и грузового белка. Впервые были обнаружены у бактерий и охарактеризованы в 1994 году. В силу необычайной стабильности, а также отсутствия токсичности и биодеградируемости эти уникальные структуры уже показали себя в качестве полезной альтернативы конвенциональным наноплатформам на основе неорганических и/или полимерных наночастиц.

Нами было показано, что стабильная экспрессия генов, кодирующих нанокомпартменты, может быть достигнута в клетках млекопитающих, при этом в оболочку нанокомпартментов возможна инкапсуляция различных грузовых белков — как нативных, так и экзогенных. Чаще всего это ферменты и флуоресцентные белки. Например, грузовым белком нанокомпартментов *Quasibacillus thermotolerans* является фермент с ферроксидазной активностью, катализирующий реакцию окисления двухвалентного железа до трехвалентного, сопровождающуюся образованием магнитных наночастиц (МНЧ). Наличие таких МНЧ в клетках дает возможность отслеживать их методом МРТ. Кроме того, в качестве комплиментарных меток, дополняющих нанокомпартменты, могут использоваться флуоресцентные или биолюминесцентные репортеры, что позволяет производить мультимодальный мониторинг клеток в организме малых лабораторных животных.

Нами был получен и охарактеризован ряд клеточных линий с вышеописанными метками. Например, клеточная линия мезенхимных стромальных клеток человека, клетки карциномы молочный железы мыши и клетки карциномы легкого мыши. Была продемонстрирована стабильность экспрессии последовательностей интереса в клетках, а также возможность применения полученных модифицированных клеточных линий для исследований на малых лабораторных животных. Наличие двух взаимодополняющих меток в клетках позволяет исследовать

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-12-00373).

© И. Е. Егорова, Д. Д. Наместникова, А. А. Дресвянникова, В. А. Саркисова, Н. А. Александрушкина, П. И. Никитин, А. Н. Габашвили, 2025

не только локализацию клеток в организме животного после введения при помощи МРТ, но также оценивать их жизнеспособность за счет наличия флуоресцентных белков или люциферазы с помощью флуоресцентной микроскопии и оптической томографии. Кроме того, нами были исследованы ограничения применения исследуемых железозапасающих белков в контексте их использования для мониторинга быстроделящихся клеток.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-76

МАННАНЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АДЪЮВАНТ ДЛЯ СУБЪЕДИНИЧНЫХ ВАКЦИН *

MANNANS FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST AS A PROMISING ADJUVANT FOR SUBUNIT VACCINES

С. А. Ежелев, Т. И. Есина, Е. А. Волосникова, Г. Г. Шимина, Е. Д. Даниленко, Д. Н. Щербаков

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

S. A. Ezhelev, T. I. Esina, E. A. Volosnikova, G. G. Shimina, E. D. Danilenko, D. N. Shcherbakov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ esina_ti@vector.nsc.ru

Аннотация

Разработан эффективный способ получения маннанов из клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* с использованием ферментативного и щелочного гидролиза. Полученный препарат показал перспективность в качестве адъюванта для субъединичных вакцин.

Abstract

An effective method for obtaining mannans from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls using enzymatic and alkaline hydrolysis has been developed. The resulting preparation has shown promise as an adjuvant for subunit vaccines.

Современные субъединичные и рекомбинантные вакцины, обладая высоким уровнем безопасности, нередко демонстрируют недостаточную иммуногенность, что требует разработки эффективных и безопасных адъювантов. Традиционные адъюванты на основе солей алюминия, несмотря на широкое применение, обладают рядом ограничений, включая местные воспалительные реакции и неспособность индуцировать клеточный иммунный ответ [1]. В этом контексте особый интерес представляют маннаны — природные полисахариды клеточных стенок дрожжей, которые взаимодействуют с Toll-подобными рецепторами (TLR2, TLR4) и рецептором маннозы (CD206), активируя как врожденный, так и адаптивный иммунитет [2]. Важными преимуществами маннанов как адъювантов являются их биосовместимость, биоразлагаемость, низкая токсичность и способность индуцировать сбалансированный гуморальный и клеточный иммунный ответ [3]. Кроме того, маннаны могут служить платформой для конъюгирования антигенов, улучшая их презентацию иммунным клеткам [4]. Эти свойства делают маннаны перспективными кандидатами для разработки адъювантов нового поколения, особенно для мукозальных и субъединичных вакцин [5].

Основное внимание в исследовании уделено разработке эффективного метода выделения маннанов. Исходную биомассу дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-448 подвергали механическому разрушению с использованием стеклянных бус в буферном растворе (0,1 М Na_2SO_4, 5 мМ Трилона Б, 40 мМ KH_2PO_4, pH 7,0). Последующую ферментативную обработку проводили препаратами «Протосубтилин Г3Х» и «ЦеллоЛюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм») при 60 °С в течение 15 ч. После центрифугирования (12 000 g, 20 мин) к супернатанту добавляли этиловый спирт в соотношении 3 : 1 для осаждения маннанов. Дополнительную очистку осуществляли щелочным гидролизом (0,2 М NaOH, 45 мин, 60 °С) с последующей нейтрализацией соляной кислотой и повторным осаждением этанолом. Выход целевого продукта составлял до 200 мг из 10 г исходного клеточного материала [6].

Очищенный препарат маннанов характеризовался высокой степенью чистоты и по результатам тестирования был отнесен к 4-му классу токсичности по классификации Сидорова. При внутрибрюшинном введении мышам CD-1 в дозе 95 мг/кг не наблюдалось изменений в поведении, потреблении пищи или массе тела животных, что подтвердило безопасность полученного соединения.

Оценку адъювантных свойств проводили на мышах BALB/c, иммунизированных рекомбинантным белком RBD (рецептор-связывающий домен поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, вариант B.1.617.2 (Delta)) в дозе 50 мкг в комбинации с маннанами (10 или 40 мкг). Наибольшая иммуногенность отмечена при использовании маннанов в дозе 40 мкг: средние титры специфических антител против гомологичного антигена

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГЗ-1/22).
© С. А. Ежелев, Т. И. Есина, Е. А. Волосникова, Г. Г. Шимина, Е. Д. Даниленко, Д. Н. Щербаков, 2025

достигали 1 : 2 477 330, что сопоставимо с группой сравнения, получавшей антиген в сочетании с гидроксидом алюминия (250 мкг). В тесте вируснейтрализации сыворотки иммунизированных животных демонстрировали активность против штаммов вируса SARS-CoV-2 Wuhan (1 : 520) и Delta (1 : 485), однако эффективность против варианта Omicron была существенно ниже (1 : 120).

Разработанный метод позволяет получать высокоочищенные маннаны с выраженными адъювантными свойствами. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования маннанов в качестве безопасной альтернативы традиционным адъювантам в составе субъединичных вакцин. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию состава вакцинных препаратов и изучение клеточных механизмов иммунного ответа.

Литература

1. Алпатова Н. А., Авдеева Ж. И., Лысикова С. Л. и др. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1) // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2020. Т. 20 (4). С. 245–256.

2. Bashiri S., Koirala P., Toth I., Skwarczynski M. Carbohydrate immune adjuvants in subunit vaccines // Pharmaceutics. 2020. Vol. 12 (10), No. 965.

3. Stambas J., Pietersz G., McKenzie I., Cheers C. Oxidised mannan as a novel adjuvant inducing mucosal IgA production // Vaccine. 2002. Vol. 20, No. 7–8. P. 1068–1078.

4. Xu Y., Ma S., Zhao J. et al. Mannan-decorated pathogen-like polymeric nanoparticles as nanovaccine carriers for eliciting superior anticancer immunity // Biomaterials. 2022. Vol. 284. Art. 121489.

5. Yu W., Shen L., Qi J., Hu T. Conjugation with loxoribine and mannan improves the immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis CFP10-TB10.4 fusion protein // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2022. Vol. 172. P. 193–202.

6. Есина Т. И., Волосникова Е. А., Щербаков Д. Н. и др. Получение маннанов из клеточных стенок дрожжей Saccharomyces cerevisiae и оценка их адъювантной способности на модели субъединичной вакцины // Acta Biomedica Scientifica. 2024. Т. 9 (4). С. 221–229.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-77

ПОЛУЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI* *

OBTAINING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NUCLEOTIDASE FROM *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*

А. Д. Ефремова[1], А. А. Логинова[1,2], Н. Н. Мордкович[1], Н. А. Окорокова[1], А. Н. Антипов[1], В. И. Тишков[1,2], А. А. Пометун[1–3]

[1]*Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*
[2]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3]*Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва*

A. D. Efremova[1], A. A. Loginova[1,2], N. N. Mordkovich[1], N. A. Okorokova[1], A. N. Antipov[1], V. I. Tishkov[1,2], A. A. Pometun[1–3]

[1]*Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, A. N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow*
[2]*Lomonosov Moscow State University*
[3]*Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow*

✉ nastya.efremova.2000@gmail.com

Аннотация

В данной работе проведены клонирование и экспрессия в *Escherichia coli* гена, кодирующего 5′-нуклеотидазу из *Limosilactobacillus reuteri,* получены белковые препараты с сигнальным пептидом и без него с различным расположением последовательности His-tag в растворимой форме. Очистку проводили с помощью металл-хелатной хроматографии. Активность некоторых форм фермента подтверждена с помощью реакции с АМФ.

Abstract

In this work, the gene encoding the 5′-nucleotidase from *Limosilactobacillus reuteri* was cloned and expressed in *Escherichia coli*, and protein preparations with and without the signal peptide were obtained, with a different arrangement of the His-tag sequence in soluble form. Purification was carried out using metal chelate chromatography. The activity of some forms of the enzyme has been confirmed by reaction with AMP.

Устойчивость патогенных бактерий к препаратам антибактериальной терапии неуклонно растет, некоторые из них уже приобрели множественную лекарственную устойчивость, что является серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Это определяет необходимость разработки новых антибактериальных препаратов, которые смогут помочь в борьбе с резистентностью к антибиотикам. Данное исследование направлено на изучение функциональной значимости и особенностей доменных пространственных структур некоторых ферментов в пробиотических штаммах лактобактерий для изучения механизма взаимодействия между патогенными штаммами и штаммами — компонентами нормальной микрофлоры, а также потенциальной разработки альтернатив существующим методам лечения бактериальных инфекций. В настоящий момент объектом исследования является фермент 5′-нуклеотидаза, выбор обусловлен его секрецией бактериями *Limosilactobacillus reuteri* при совместном культивировании с патогенным штаммом *Klebsiella pneumoniae* [1].

Ранее было показано, что при проведении сокультивирования бактерий рода *Lactobacillus* и бактерий рода *Klebsiella* два штамма лактобактерий (*Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F) угнетают рост бактерий *Klebsiella pneumoniae*, выделяя в ответ на действие патогена группу белков различных классов и функциональной значимости. Данные белки были идентифицированы с помощью тандемной MALDI/TOF/TOF-спектрометрии. В частности, был выявлен фермент бифункциональная металлофосфатаза, или 5′-нуклеотидаза, из *L. reuteri* (LreBM) [1]. Благодаря тому, что этот вид микроорганизмов является частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и влагалища человека, потенциальное применение ферментов из этих бактерий в терапевтических целях, вероятно, не будет провоцировать иммунный ответ. И хотя *L. reuteri* хорошо известна своими пробиотическими свойствами, информация о ее белках в современной научной литературе пока ограничена.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-64-10029).

© А. Д. Ефремова, А. А. Логинова, Н. Н. Мордкович, Н. А. Окорокова, А. Н. Антипов, В. И. Тишков, А. А. Пометун, 2025

В рамках настоящей работы нами было осуществлено моделирование структур для нескольких форм фермента 5′-нуклеотидазы. Получены четыре генетические конструкции, содержащие гены 5′-нуклеотидазы Lre BM с фрагментами, кодирующими шесть остатков гистидина на N- и C-концах, с сигнальными пептидами и без них. Последовательности были подтверждены секвенированием. Экспрессию гена нуклеотидазы проводили в клетках *E. coli*, очистку фермента осуществляли методом металл-хелатной хроматографии, наличие и аминокислотная последовательность 5′-нуклеотидазы подтверждены с помощью MALDI/TOF/TOF-спектрометрии. Показано, что полученные препараты нуклеотидазы проявляют активность с АМФ.

Литература

1. Savinova O. S., Glazunova O. A., Moiseenko K. V. et al. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria Limosilactobacillus reuteri LR1 and Lacticaseibacillus rhamnosus F and Multidrug Resistant Strain of Klebsiella pneumonia // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, No. 20. P. 10999.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-78

МЕТАГЕНОМНЫЙ МАЙНИНГ КАК ИНСТРУМЕНТ БИОРАЗВЕДКИ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ АНТРОПОГЕННО НАРУШЕННЫХ ЭКОТОПОВ*

METAGENOME MINING INSTRUMENTAL FOR BIOPROSPECTING MICROBIAL COMMUNITIES FROM ANTHROPOGENICALLY DISTURBED ECOTOPES

П. А. Зайцев, А. А. Зайцева, Б. М. Шурыгин, Г. А. Дольникова, С. Г. Васильева, Е. С. Лобакова, А. Е. Соловченко

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

P. A. Zaytsev, A. A. Zaytseva, B. M. Shurygin, G. A. Dolnikova, S. G. Vasilieva, E. S. Lobakova, A. E. Solovchenko

Lomonosov Moscow State University

✉ zaytsevpa@my.msu.ru

Аннотация

Эвтрофицированные фосфором экотопы — водоемы, расположенные вблизи апатит-нефелиновых месторождений, потенциальные источники альго-бактериальных сообществ с высокой толерантностью к экзогенному фосфату и способностью к его биоаккумуляции. Функциональная метагеномика и высокопроизводительное фенотипирование — инструмент для поиска целевых штаммов, создания искусственных сообществ и мониторинга их эффективности в процессах очистки сточных вод.

Abstract

Phosphorus-polluted areas such as ponds located in the vicinity of the Apatite-Nepheline mine “ANOF-2” may harbour algal-bacterial communities tolerant to exogenous phosphate and highly capable of its biocapture. The combination of functional metagenomics with high-throughput phenotyping is instrumental for bioprospecting of microbial strains suitable for artificial consortia design and for the monitoring of their performance in wastewater treatment.

Изучение формирования альго-бактериальных сообществ в условиях повышенного содержания в среде микрополлютантов, таких как неорганический фосфат, тяжелые металлы и микропластик, является ключом к пониманию механизмов устойчивости водных экосистем. Подобные сообщества также могут служить источниками штаммов — биоаккумуляторов химических элементов и/или ассоциаций микроорганизмов с подобными свойствами — основы перспективных биоинженерных технологий для очистки от них муниципальных и промышленных стоков. Районы разработки полезных ископаемых, таких как апатит-нефелиновые руды или уголь, создают условия для формирования в окрестных водоемах искомых альго-бактериальных сообществ. Анализ данных систем значительно упрощается в последнее время за счет применения методов метагеномики и фенотипирования оксигенных фототрофных микроорганизмов.

В 2023–2024 годах были собраны образцы альго-бактериальных сообществ из экотопов с высокой антропогенной нагрузкой: 1) природные водоемы и отстойники вблизи открытого апатит-нефелинового карьера и обогатительной фабрики (АНОФ-2) (окрестности г. Апатиты; 67°34′03″N, 33°23′36″E); 2) отстойники вблизи открытого угольного разреза «Моховский» (Кемеровская область; 54°35′54″N, 86°20′37″E); 3) водно-болотные угодья вблизи полигона твердых бытовых отходов (о. Большой Соловецкий; 65°01′08″N, 35°43′53″E). Проведено выделение тотальной ДНК из собранных образцов и секвенирование ампликонов фрагмента V4 гена *16S рРНК* и фрагмента ITS2 гена *18S рРНК* по методу ДНК-метабаркодинга на платформе Illumina с последующим таксономическим анализом данных в программе QIIME2 и функциональным анализом по алгоритму PICRUSt2. Из этих же образцов выделяли монокультуры оксигенных фототрофных микроорганизмов (ОФМ) и чистые культуры бактерий на соответствующих селективных средах, которые затем дополнительно идентифицировались с помощью методов молекулярной филогенетики. Полученные культуры отбирали для создания искусственных альго-бактериальных сообществ для очистки сточных вод от модельного микрополлютанта — избытка неорганического фосфора. Отбор проводили в формате высокопроизводительного скрининга на предмет стабильности фотосинтетического аппарата (метод PAM-флуориметрии), аккумуляции внутриклеточных резервов фосфора (цитохимическое окрашивание DAPI), а также по степени биоизъятия фосфата из среды (хромогенный тест с молибденовым синим). Перспективные сообщества испытывали в модельном каскадном фотобиореакторе для очистки реальных муниципальных сточных вод.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-44-00006).

© П. А. Зайцев, А. А. Зайцева, Б. М. Шурыгин, Г. А. Дольникова, С. Г. Васильева, Е. С. Лобакова, А. Е. Соловченко, 2025

Большинство проанализированных образцов содержали чтения ОФМ (эукариотических представителей отделов *Chlorophyta*, а также одноклеточных и трихомных представителей класса *Cyanophyceae*) и гетеротрофных бактерий с доминированием филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Примечательно, что максимальное биоразнообразие установлено для сообществ постоянных природных водоемов, минимальное — в сообществах временных искусственных водоемов. Среди эукариотических организмов были обнаружены такие представители отдела *Chlorophyta*, как рр. *Chlamydomonas, Chlorella, Micractinium, Chlorococcum*, а также представители класса *Cyanophyceae* из рр. *Nostoc*, *Anabaena*, *Leptolyngbya* и *Cyanobium*. С помощью микробиологических методов получен ряд монокультур эукариотических микроводорослей, цианобактерий и бактерий. В частности, из образцов сообществ водоемов окрестностей АНОФ-2 были выделены культуры *Micractinium simplicissimum*, *Chlamydomonas applanata, Desmodesmus armatus, Micractinium inermum, Cylindrospermum* sp. и *Nodosilinea* sp. Среди бактерий были выявлены представители рр. *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Devosia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus* и *Brevundimonas* — известные своей способностью вступать во взаимовыгодные отношения с микроводорослями и цианобактериями, а также толерантностью к высокой концентрации экзогенного фосфата. Высокопроизводительное фенотипирование выявило, что эукариотические микроводоросли из р. *Micractinium* обладают повышенной толерантностью к избытку экзогенного фосфора, что особенно выражено в ассоциации с цианобактерией из р. *Nodosilinea*. Было показано, что альго-бактериальное сообщество на основе микроводорослей из р. *Micractinium* стабильно осуществляло биоизъятие неорганического фосфора из муниципальных сточных вод в течение 4 циклов продолжительностью 7 суток каждый.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-79

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕВИРУСНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МРНК НА ОСНОВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS AND STANDARDIZATION OF PRODUCTION OF NON-VIRAL MRNA CARRIERS BASED ON LIPID NANOPARTICLES

А. С. Иванов, Е. А. Корчевец, М. О. Неруш, Д. С. Кульчановская,
К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Ю. М. Коцур, А. Р. Муслимов

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

A. S. Ivanov, E. A. Korchevets, M. O. Herush, D. S. Kulchanovskaya,
K. A. Gusev, D. N. Maymistov, J. M. Kotsur, A. R. Muslimov

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

✉ artem.ivanov@pharminnotech.com

Аннотация

Применение продуктов на основе мРНК и липидных наночастиц требует строгого контроля качества критических параметров. Разработаны и частично валидированы методы контроля качества на этапах производства и доклинических исследований.

Abstract

The use of products based on mRNA and lipid nanoparticles requires strict quality control of critical parameters. Methods for quality control at the production and preclinical research stages have been developed and partially validated

Введение

Технологии модификации клеток на основе матричных РНК (мРНК) представляют значительный интерес в контексте создания платформенных решений в генной и клеточной терапии. Широкое клиническое внедрение требует контроля качества, включающего оценку активной фармацевтической субстанции и полупродуктов на различных этапах производства. Работа направлена на разработку методов контроля важнейших параметров качества и стандартизации на различных этапах: от синтеза мРНК методом *in vitro* транскрипции (IVT) до включения полученных нуклеиновых кислот в липидные наночастицы (ЛНЧ) и доклинических исследований *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Для отработки метода невирусной доставки была выбрана мРНК гена люциферазы (1943 п. н.), полученная в результате IVT с котранскрипционным кэпированием и полиаденилированием. Параметрами контроля качества в контексте работы являлась оценка идентичности, чистоты, целостности синтезированного транскрипта, оценка посттранскрипционных изменений, оценка физико-химических показателей ЛНЧ, оценка эффективности инкапсуляции мРНК и исследование влияния комплекса мРНК-ЛНЧ на показатели жизнеспособности клеток. Идентичность синтезированной мРНК оценивалась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующим анализом плавления с высоким разрешением (high-resolution melting — HRM). Для оценки чистоты и целостности мРНК применялись методы электрофорезов в денатурирующих агарозном (АГ) и полиакриламидном (ПААГ) гелях. Эффективность кэпирования оценивалась при помощи изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в ПААГ в узком диапазоне pH, адаптированном под анализ НК. Исследование примесей было проведено при помощи ПЦР в реальном времени (РВ). Для оценки эффективности инкапсуляции мРНК, размерности и индекса полидисперсности ЛНЧ был использован метод динамического светорассеяния (Stunner, Unchained Labs). Для оценки эффективности инкапсуляции также применялись флуориметрический метод со специфическим красителем Ribo488 (Lumiprobe) и метод визуализационной полуколичественной оценки концентрации РНК по АГ-ЭФ. Цитотоксичность комплекса мРНК-ЛНЧ оценивалась с помощью теста метаболической активности с резазурином.

© А. С. Иванов, Е. А. Корчевец, М. О. Неруш, Д. С. Кульчановская, К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Ю. М. Коцур, А. Р. Муслимов, 2025

Результаты

Разработаны и частично валидированы методы контроля критических показателей мРНК и ЛНЧ. Идентичность транскрипта исходной ДНК-матрице была подтверждена HRM-анализом. Применение ПЦР-РВ для оценки нежелательных примесей показало полное их отсутствие. Применение АГ- и ПААГ-ЭФ продемонстрировало чистоту и целостность синтезированного транскрипта. Сравнение сходимости результатов оценки эффективности загрузки флуориметрическим методом, методом динамического светорассеяния и полуколичественным визуализационным методом по АГ-ЭФ продемонстрировало отсутствие статистически значимых различий ($p < 0,05$). По результатам теста с резазурином используемые комплексы мРНК-ЛНЧ показали отсутствие значимой цитотоксичности при использовании в рабочем диапазоне концентраций.

Выводы

Разработанные в ходе работы методы контроля качества мРНК после IVT и инкапсуляции в ЛНЧ позволяют контролировать ключевые показатели качества для дальнейшей оценки эффективности и безопасности применяемых комплексов мРНК-ЛНЧ в доклинических исследованиях, а также создают предпосылки для масштабирования производства лекарственных средств на основе мРНК и трансфера технологий.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-80

РАЗРАБОТКА HAEE-ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА: *IN VITRO* И *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЯ *

DEVELOPMENT OF HAEE-FUNCTIONALIZED MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ALZHEIMER'S DISEASE THERANOSTICS: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES

А. В. Иванова[1,2], П. А. Лазарева[1], Н. С. Чмелюк[1,2], В. В. Вадехина[1], М. А. Абакумов[1,2]

[1] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*
[2] *Университет науки и технологий МИСИС, Москва*

A. V. Ivanova[1,2], P. A. Lazareva[1], N. S. Chmelyuk[1,2], V. V. Vadehina[1], M. A. Abakumov[1,2]

[1] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[2] *National University of Science and Technology MISIS, Moscow*

✉ super.fosforit@yandex.ru

Аннотация

Разработаны HAEE-функционализированные магнитные наночастицы (МНЧ) для терапии болезни Альцгеймера. МНЧ демонстрируют *in vitro* связывание с β-амилоидом и *in vivo* способность преодолевать ГЭБ (IVIS®, конфокальная микроскопия). МРТ выявило изменение Т2-релаксации в мозге 5xFAD-мышей, что может указывать на взаимодействие МНЧ с амилоидными бляшками. Система требует оптимизации фармакокинетики для усиления доставки в ЦНС.

Abstract

HAEE-functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) have been developed for the treatment of Alzheimer's disease. MNPs demonstrate in vitro binding to β-amyloid and in vivo the ability to cross the BBB (IVIS®, confocal microscopy). MRI revealed a change in T2 relaxation in the brain of 5xFAD mice, which may indicate an interaction of MNPs with amyloid plaques. The system requires optimization of pharmacokinetics to enhance delivery to the CNS.

Нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера (БА), представляют серьезную медико-социальную проблему из-за роста распространенности и отсутствия эффективных методов лечения. Образование амилоидных агрегатов и тау-белков рассматривается как ключевое звено патогенеза БА, однако детальные механизмы этого процесса остаются не до конца изученными и требуют использования современных методов визуализации. Учитывая центральную роль амилоидогенеза в развитии БА, интенсивно разрабатываются подходы для направленного разрушения патологических белковых скоплений. В этом контексте особый интерес представляют гибридные системы, сочетающие таргетные биомолекулы (например, амилоид-связывающий пептид HAEE, обладающий высокой аффинностью к β-складчатым структурам) с мультифункциональными наноплатформами, что создает основу для разработки тераностических систем двойного действия.

В данной работе для создания таких систем были синтезированы магнитные наночастицы оксида железа (МНЧ). Использование бензилового спирта в качестве реакционной среды позволило рассматривать МНЧ как перспективный материал для конструирования многофункциональных наночастиц. Последующая модификация поверхности МНЧ молекулами 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты и поли(этилен гликоль)2-аминоэтилового эфира уксусной кислоты обеспечила их стабильность в физиологических условиях. Отработанные методы функционализации были успешно применены для иммобилизации флуоресцентно-меченого тетрапептида HAEE на поверхности МНЧ. Полученные МНЧ, функционализированные HAEE (МНЧ-HAEE) оказались стабильными и связывались с белковыми агрегатами амилоида в экспериментах *in vitro* на клетках. Для оценки воздействия МНЧ-HAEE на амилоидные агрегаты использовали клеточную модель SH-SY5Y.

При изучении биораспределения МНЧ-HAEE у трансгенных (APP/PS1, 5xFAD) и WT-мышей методом IVIS® выявлено: 1) статистически значимое преимущественное накопление частиц в почках по сравнению с мозгом ($p < 0{,}01$); 2) детекция флуоресцентного сигнала в мозговой ткани, демонстрирующая способность МНЧ-HAEE преодолевать ГЭБ. Эти результаты подтверждают потенциал разработанной системы для направ-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания «Создание радиофармацевтического лекарственного препарата для диагностики болезни Альцгеймера с использованием тетрапептида HAEE в качестве векторной молекулы», регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 1024110600012-8-3.2.25;3.2.26;3.2.12.

© А. В. Иванова, П. А. Лазарева, Н. С. Чмелюк, В. В. Вадехина, М. А. Абакумов, 2025

ленной доставки в ЦНС, хотя выявленное преимущественное накопление в почках указывает на необходимость оптимизации фармакокинетического профиля для усиления мозговой биодоступности.

Для оценки эффективности МРТ-визуализации и распределения препаратов *in vivo* были исследованы трансгенные мыши линии 5xFAD. По данным МРТ введение МНЧ-НАЕЕ приводило к увеличению времени Т2-релаксации через 24 ч в опытной группе по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об изменении распределения железа. Для более точной интерпретации изменений Т2-релаксации были проведены дополнительные исследования методом конфокальной микроскопии, которая подтвердила способность МНЧ-НАЕЕ преодолевать ГЭБ и обнаруживаться в головном мозге через 24 ч после введения как у опытных, так и у контрольных животных. Полученные данные позволяют предположить, что изменения Т2-релаксации у мышей 5xFAD могут быть связаны с модификацией отложений железа в амилоидных бляшках, однако этот механизм требует дальнейшего изучения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-81

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ С ПЕРСПЕКТИВОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В НЕЙРОНАУКАХ*

BIOTECHNOLOGICAL PLATFORM FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT NEUROTRANSMITTER ENZYMES WITH POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATIONS IN NEUROSCIENCE

В. В. Ильницкая

Московский государственный институт международных отношений (университет) МИД Российской Федерации

V. V. Ilnitskaya

Moscow State Institute of International Relations (University) of the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation

✉ vika_ilnickaya@mail.ru

Аннотация

Разработана и апробирована биотехнологическая платформа для производства высокоактивных рекомбинантных ферментов с высокой каталитической активностью, стабильностью при физиологических условиях и низкой цитотоксичностью. Использованы генно-инженерные системы экспрессии в *E. coli*, HEK293; очистка проводится методами ионообменной и аффинной хроматографии. Биопрепараты имеют потенциал для терапии нейродегенеративных заболеваний и расстройств ЦНС.

Abstract

A biotechnological platform was developed and validated for producing highly active recombinant enzymes with high catalytic activity, stability under physiological conditions, and low cytotoxicity. Gene-engineered expression systems in *E. coli* and HEK293 were used; purification employed ion-exchange and affinity chromatography. The bioproducts show potential for therapy of neurodegenerative diseases and CNS disorders.

Введение

Нейромедиаторные ферменты играют ключевую роль в регуляции синаптической передачи и поддержании гомеостаза центральной нервной системы [1]. Нарушения активности данных ферментов ассоциированы с развитием заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, депрессия и другие нейродегенеративные патологии [2, 3]. Традиционные методы получения ферментных препаратов имеют ограничения по стабильности и активности. Генно-инженерные технологии позволяют создавать рекомбинантные ферменты с улучшенными фармакологическими характеристиками, что открывает новые возможности для биотехнологии и медицины [4, 5].

Цель исследования — разработать эффективные методы экспрессии и очистки рекомбинантных ферментов, участвующих в метаболизме основных нейротрансмиттеров, и провести их биохимическую и биологическую характеристику с целью создания перспективных биопрепаратов для нейротерапии.

Материалы и методы

– Гены дофамин-β-гидроксилазы, ацетилхолинэстеразы и моноаминоксидазы клонированы в плазмиды экспрессии для систем *E. coli* и HEK293.

– Оптимизация условий культивирования включала подбор температуры, времени индукции и состава питательной среды.

– Очистка проводилась методами ионообменной и аффинной хроматографии с использованием специфических лигандов.

– Каталитическая активность оценивалась с помощью спектрофотометрического анализа субстратных превращений, расчетом кинетических параметров K_m и V_{max}.

– Стабильность ферментов исследовалась при 4 и 37 °C в физиологических буферах.

– Цитотоксичность и биосовместимость изучались на нейрональных культурах методом МТТ.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-10105).

© В. В. Ильницкая, 2025

Результаты

– Достигнута высокочистота (> 95 %) рекомбинантных ферментов по SDS-PAGE.

– Для DβH определены кинетические параметры K_m = 4,2 ± 0,3 μM, V_{max} = 34,5 ± 1,7 нмоль/мин/мг белка, что соответствует или превосходит естественные аналоги [1].

– Ацетилхолинэстераза сохраняла более 95 % активности спустя 30 дней хранения при 4 °C.

– Моноаминоксидаза сохраняла 85 % активности после 48 ч инкубации при 37 °C.

– Культивирование нейрональных клеток в присутствии ферментов показало менее 10 % цитотоксичности в сравнении с контролем.

– Рекомбинантные ферменты демонстрируют стабильную работу в диапазоне pH 6,8–7,4, что соответствует физиологическим условиям ЦНС [5].

Кинетические параметры рекомбинантных ферментов

Фермент	K_m (μM)	V_{max} (нмоль/мин/мг)	Срок стабильности, дни
Дофамин-β-гидроксилаза (DβH)	4,2 ± 0,3	34,5 ± 1,7	> 30
Ацетилхолинэстераза (AChE)	1,1 ± 0,1	29,7 ± 2,0	> 30
Моноаминоксидаза (MAO)	3,8 ± 0,4	25,1 ± 1,5	> 15

Обсуждение

Представленные результаты подтверждают высокую эффективность и стабильность рекомбинантных нейромедиаторных ферментов, что делает их перспективными кандидатами для трансляционных исследований и клинической разработки лекарственных средств. Использование гибридных систем генной экспрессии и усовершенствованных методов очистки позволяет получить белки с оптимальными характеристиками. Такой подход обеспечивает основу для создания новых терапевтических препаратов, направленных на нормализацию нейромедиаторных уровней в терапевтических задачах нейронаук [2, 3].

Заключение

Биотехнологическая платформа рекомбинантного производства ключевых нейромедиаторных ферментов с высокой спецификой и стабильностью была успешно разработана. Представленные биопрепараты имеют потенциал для применения в нейротерапии и открывают новые перспективы для интеграции биотехнологий и нейронаук в фармакологические исследования.

Литература

1. Dronkers N. F. et al. Lesion analysis in aphasia // Brain. 2021. Vol. 144. P. 1234–1247. URL: https://academic.oup.com/brain/article/144/4/1234/6180057 (date of access: 10.05.2025).

2. Friederici A. D. Language in our brain // Cambridge, MA: MIT Press, 2017. URL: https://mitpress.mit.edu/books/language-our-brain (date of access: 13.07.2025).

3. Ramus F. Developmental dyslexia // Neuron. 2023. Vol. 111. P. 456–470. URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s41809-023-00118-2 (date of access: 10.07.2025).

4. Shaywitz S. E. Overcoming dyslexia // New York: Vintage, 2020. URL: https://www.penguinrandomhouse.com/books/567053/overcoming-dyslexia-by-sally-e-shaywitz-md/ (date of access: 30.06.2025).

5. Vellutino F. R. et al. Cognitive profiles of dyslexia // J. Neurosci. 2024. Vol. 44. P. 234–250. URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S169726002400084X (date of access: 22.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-82

БИОСЕНСОРНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ ТОЧЕК И ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ *

BIOSENSOR SYSTEM BASED ON CARBON DOTS AND ENZYMES TO DETERMINE FOOD QUALITY

Я. А. Ионов, Е. А. Назарова

Университет ИТМО, Санкт-Петербург

Y. A. Ionov, E. A. Nazarova

ITMO University, Saint Petersburg

✉ yaionov@itmo.ru

Аннотация

В настоящее время нередки случаи приобретения некачественных и фальсифицированных продуктов питания. Отсутствие универсальных и портативных методов обнаружения аналитов не позволяет выявить небезопасные продукты до их попадания на полки магазинов, что негативно сказывается на здоровье населения. В данном исследовании разработаны методы определения пероксида водорода с помощью углеродных точек и глюкозы с помощью углеродных точек и глюкозооксидазы.

Abstract

Currently, cases of purchasing low-quality and adulterated food products are common. Due to the lack of universal and portable methods for detecting unsafe analytes, it is not always possible to identify low-quality products before they are placed on store shelves, which is why public health suffers. In this study, methods for quantitative determination of hydrogen peroxide using carbon dots and glucose using carbon dots and glucose oxidase were developed.

С момента появления пищевой промышленности ей всегда требовались быстрые и точные методики определения параметров продуктов. В реальных условиях необходим метод, позволяющий проводить анализ на месте и получать точную интерпретацию результата. В настоящее время существует множество способов оценки качества продуктов, таких как спектральный анализ, масс-спектрометрия, хроматография, но все они требуют больших временных и денежных затрат, а также специального и сложного оборудования. Изготовление новых, совместимых со смартфоном тест-систем на основе функциональных материалов и биомолекул позволит проводить анализ в любое удобное время и любому пользователю. В качестве перспективного материала для создания сенсора в последнее время используют углеродные материалы.

Углеродные точки (УТ) — наночастицы, способные флуоресцировать под ультрафиолетом, — были синтезированы двумя разными методами (без носителя и на носителе в виде нанокристаллов хитина [1, 2]) с использованием допирующих веществ, необходимых для реагирования на перекись водорода [3]. В процессе разложения перекиси водорода выделяются гидроксильные радикалы, которые имеют сильное влияние на поверхностные группировки УТ [4], в результате чего изменяется флуоресценция. По степени гашения можно судить о количестве аналита в образце, используя калибровочную кривую с известными концентрациями аналита. Таким образом, можно детектировать не только перекись водорода, но и другие аналиты, которые окисляются оксидазами до перекиси водорода. Соответственно, были разработаны сенсоры на определение глюкозы как модельные системы проверки работоспособности метода детекции, с использованием глюкозооксидазы и УТ без носителя и на нанокристаллическом хитине.

На первом этапе проводилось изучение взаимного влияния компонентов сенсорной системы, которое выявило незначительные отклонения в пределах 5 % от исходной активности фермента и интенсивности флуоресценции. Для разработки метода анализа исследованы два типа схем с ионами железа (II) и (III). Время реакции определения пероксида водорода и глюкозы составляет 20 мин.

Для обоих аналитов калибровочные кривые были построены с помощью планшетного ридера TECAN и специально разработанного флуоресцентного устройства на базе смартфона и программы ImageJ. В программе проводится обработка фотографий, где по степени уменьшения интенсивности серого оттенка пикселя судят о степени гашения интенсивности флуоресценции тест-системы. Установлено, что УТ на хитине в присутствии ионов железа (II) имеют линейную зависимость (R^2 = 0,9825) в широком диапазоне концентраций перекиси во-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-76-10093).

© Я. А. Ионов, Е. А. Назарова, 2025

дорода от 13 до 440 мМ. Для определения количества глюкозы наиболее точной оказалась схема с УТ без носителя в присутствии ионов железа (II). Калибровка представлена двумя линейными зависимостями в диапазоне концентраций от 0,55 до 4 мМ и от 4 до 60 мМ (R^2 = 0,9799, R^2 = 0,919). Для проверки селективности системы использовались моно- и дисахариды. Для биосенсора с УТ без носителя отклик на другие сахара составил менее 11 % относительно реакции на глюкозу. Сенсорные системы были протестированы на реальных продуктах: измеренная концентрация добавленного пероксида водорода в молоке составила 8,5 ± 2,1 мМ, содержащейся глюкозы в яблочном соке — 57 ± 8 мМ. В результате данный метод может быть развит для других аналитов и стать универсальной основой для создания новых флуоресцентных тест-систем.

Результаты данного исследования могут быть использованы для постоянного мониторинга качества на всех стадиях жизненного цикла продукта, включая этап реализации. Это поможет минимизировать репутационные риски для производителей и поставщиков, а также усилить защиту здоровья потребителей.

Литература

1. Zhang Y. Highly fluorescent nitrogen and boron doped carbon quantum dots for selective and sensitive detection of Fe3+ // Journal of Materials Chemistry B. 2021. Vol. 9, No. 23. P. 4654–4662.

2. Ngo T. S. et al. Reusable carbon dot/chitin nanocrystal hybrid sorbent for the selective detection and removal of Cr(VI) and Co(II) ions from wastewater // Carbohydrate Polymers. 2023. Vol. 304. P. 120471.

3. Yan F. The fluorescence mechanism of carbon dots, and methods for tuning their emission color: a review // Microchimica Acta. 2019. Vol. 186, No. 8.

4. Hu S. et al. Modulation and effects of surface groups on photoluminescence and photocatalytic activity of carbon dots // Nanoscale. 2013. Vol. 5, No. 23. P. 11665.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-83

УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ *PANTOEA BRENNERI* К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ*

RESISTANCE OF *PANTOEA BRENNERI* STRAINS TO HEAVY METALS

Р. Р. Исламов, Е. С. Васильева, Л. В. Сокольникова, А. Д. Сулейманова

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

R. R. Islamov, E. S. Vasileva, L. V. Sokolnikova, A. D. Suleimanova

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ renalplan07@gmail.com

Аннотация

Исследована устойчивость штаммов *Pantoea brenneri* (3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1) к токсичным солям цинка, меди, хрома и кадмия. С помощью геномного анализа выявлены гены, обеспечивающие устойчивость к тяжелым металлам. Результаты демонстрируют потенциал использования штаммов для биоремедиации почв.

Abstract

The resistance of *Pantoea brenneri* strains (3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1) to toxic salts of zinc, copper, chromium, and cadmium has been studied. Genomic analysis has identified heavy metal resistance genes. The results demonstrate the applicability of the strains for soil bioremediation.

Бактерии рода *Pantoea* являются перспективными агентами биоремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ). Однако их устойчивость к ТМ изучена недостаточно, особенно на генетическом уровне. Стандартные методы (например, определение минимальной ингибирующей концентрации, МИК) не раскрывают молекулярных механизмов резистентности [1]. Целью работы явился комплексный анализ устойчивости штаммов *P. brenneri* к ТМ.

Исследовали штаммы *P. brenneri* 3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1. Устойчивость бактерий к ТМ оценивали на жидкой и агаризованной питательной среде LB, содержащей следующие соли: $ZnSO_4$, $CuCl_2$, $K_2Cr_2O_7$, $CdCl_2$. МИК определяли по отсутствию роста после 48 ч инкубации при 30 °C [2]. Геномы (депонированы в GenBank под номерами доступа JBCGBG000000000.1, JMRT00000000.3, JBCGBH000000000.1 и JBCGBI000000000.1) анализировали с помощью программы Proteinortho v.6.

На твердой питательной среде МИК $ZnSO_4$ и $K_2Cr_2O_7$ для штаммов *P. brenneri* составила 800 мг/л, однако для штамма *P. brenneri* 3.5.2 МИК $ZnSO_4$ была ниже — 400 мг/л. Для $CuCl_2$ и $CdCl_2$ ингибирование роста не наблюдалось даже при достижении максимальных концентраций — 1600 мг/л для ионов меди и 200 мг/л для ионов кадмия. На жидкой питательной среде МИК ряда тяжелых металлов снизилась для всех штаммов *P. brenneri:* для $K_2Cr_2O_7$ до 100 мг/л, для $CuCl_2$ до 800 мг/л. В то же время для $ZnSO_4$ МИК осталась неизменной — 800 мг/л. Устойчивость к $CdCl_2$ сохранилась на экстремально высоком уровне (МИК > 320 мг/л).

Анализ геномов исследуемых бактерий позволил идентифицировать наличие генов *copA*, кодирующих медь-экспортирующую АТФазу P-типа, генов *copC*, *copD,* кодирующих периплазматический и мембранный медь-связывающие белки, и гены систем транспорта ионов тяжелых металлов (Zn/Cd/Hg/Pb-АТФазы, MerR-регуляторы). Кроме того, было выявлено множество генов цинк-связывающих белков, 6 генов специфичных цинковых транспортеров и ген цинк-связывающего белка семейства YnfU.

Таким образом, полученные данные демонстрируют потенциал использования штаммов *Pantoea brenneri* в качестве перспективных агентов биоремедиации почв, а также раскрывают геномные детерминанты, обеспечивающие устойчивость исследуемых бактерий к тяжелым металлам.

Литература

1. Lekired A., Cherif-Silini H., Silini A., Ben Yahia H. Comparative genomics reveals the acquisition of mobile genetic elements by the plant growth-promoting *Pantoea eucrina* OB49 in polluted environments // Genomics. 2023. Vol. 115, No. 2. P. 110579.

2. Ullah A. Phytoremediation of heavy heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review // Environmental and Experimental Botany. 2015. Vol. 117. P. 28–40.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-26-00289).

© Р. Р. Исламов, Е. С. Васильева, Л. В. Сокольникова, А. Д. Сулейманова, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-84

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ В CHO-S

DEVELOPMENT OF TRANSIENT CHO-S EXPRESSION PLATFORM

А. С. Казакова, А. А. Еврейская, А. К. Зенкова, Е. А. Стеблева, А. А. Ментова, З. Р. Хасаншина, М. Д. Бочкарева

R&D ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург

A. S. Kazakova, A. A. Evreiskaya, A. K. Zenkova, E. A. Stebleva, A. A. Mentova, Z. R. Khasanshina, M. D. Bochkareva

R&D GEROPHARM, Saint Petersburg

✉ anna.kazakova@gerophar m.com

Аннотация

Разработка платформы транзиентной экспрессии в клетках CHO-S направлена на оптимизацию ключевых этапов с целью снижения затрат, повышения выхода и качества рекомбинантного белка. В исследовании проведен отбор оптимальных культуральных сред и трансфектантов, доступных на российском рынке, с учетом критических параметров экспрессии и жизнеспособности клеток. Результаты исследования позволяют стандартизовать и ускорить процесс разработки.

Abstract

The development of a transient expression platform in CHO-S cells is aimed at optimizing key stages to reduce costs, increase yield, and improve the quality of the recombinant protein. The study involved selecting optimal culture media and transfectants available on the Russian market, taking into account critical parameters of expression and cell viability. The results of the study enable the standardization and acceleration of the development process.

Введение

Производство терапевтических рекомбинантных белков в фармацевтической промышленности демонстрирует устойчивый рост. На текущий момент свыше 89 % белков, получаемых в клетках млекопитающих, производят с помощью CHO-S (Chinese Hamster Ovary-Suspension) [1]. Эффективным методом получения рекомбинантных белков без создания стабильных клеточных линий является транзиентная экспрессия. Данный метод позволяет сравнивать элементы экспрессионной системы, варианты терапевтических молекул и быстро нарабатывать препаративные количества белка для первичных этапов фармацевтической разработки [2]. Выбор культуральных сред, трансфектантов и условий трансфекции продукт-специфичен, но платформенная технология с предопределенными компонентами может сократить время разработки и позволить оптимизировать ключевые параметры под конкретный продукт.

В данной работе акцент сделан на двух критически важных этапах: подборе оптимальных культуральных сред для клеток CHO-S и оптимизации параметров трансфекции. Среда для культивирования является ключевым элементом, влияющим на жизнеспособность, скорость удвоения, морфологию, предельную плотность клеток и синтез целевого белка. Неоптимальная среда может ухудшать состояние клеток, снижать выход и качество экспрессируемого белка. Эффективность трансфекции влияет на выход целевого продукта, поэтому важно выбрать трансфектант, обеспечивающий высокую эффективность доставки нуклеиновых кислот, воспроизводимость и минимальную цитотоксичность.

В условиях увеличения стоимости и удлинения сроков поставок реагентов на российском рынке проведен скрининг коммерчески доступных культуральных сред и трансфектантов, произведенных в России, Китае и Индии.

Цель работы — провести скрининговые сравнения сред для культивирования клеток и трансфицирующих агентов, выбрать лучшие по критическим показателям качества для разработки платформенной технологии транзиентной экспрессии в CHO-S.

Материалы и методы

В качестве тестируемых сред для культивирования были выбраны среды от Bioengine (B600S, B601S, B100S), Eminence (EmCD CHO101, EmCD CHO121), JSBio (CD CHO011, CD CHO012, CD CHO050), HiMedia. На рис. 1 показана схема экспериментов по тестированию сред. Критериями успешной адаптации к среде являлись: морфология клеток, сохранение скорости роста (удвоение 16–24 ч), поддержание жизнеспособности > 95 %, возможность роста до 1×10^7 кл/мл.

© А. С. Казакова, А. А. Еврейская, А. К. Зенкова, Е. А. Стеблева, А. А. Ментова, З. Р. Хасаншина, М. Д. Бочкарева, 2025

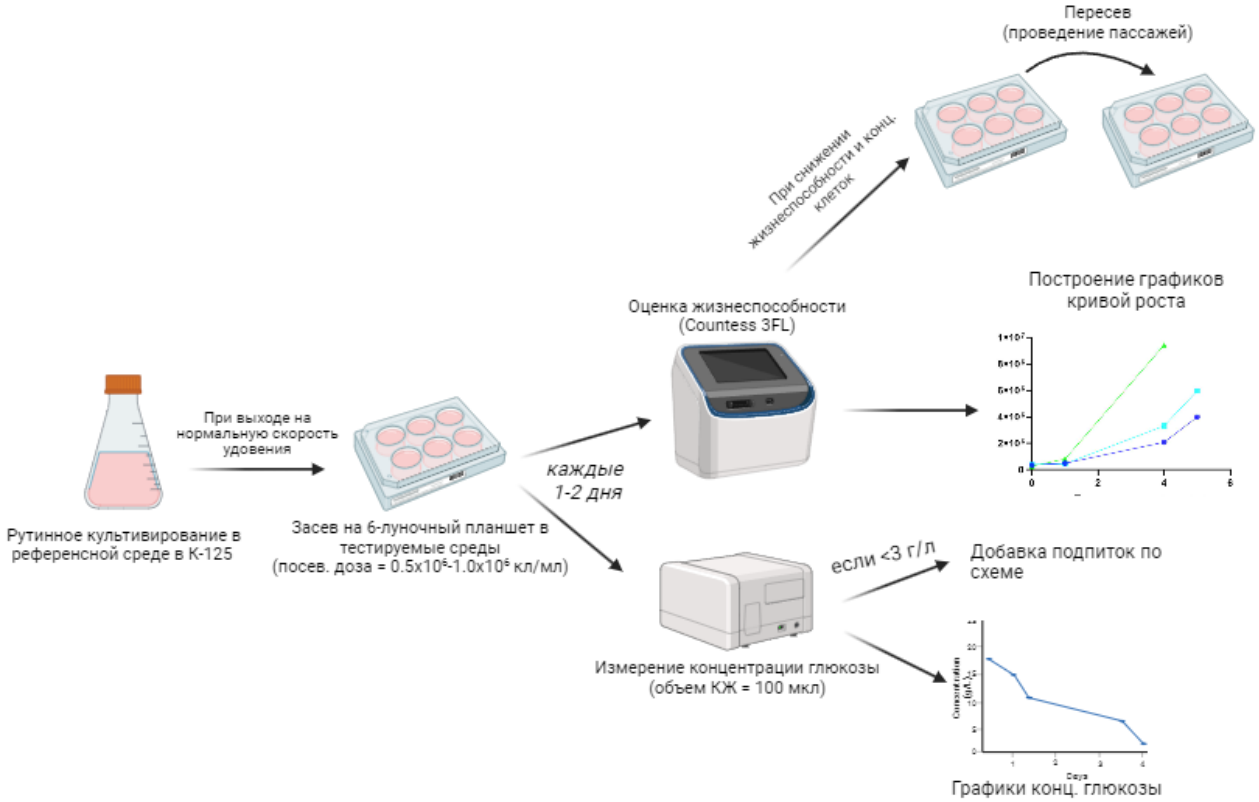


Рис. 1. Схема экспериментов по тестированию сред

Тестируемыми трансфектантами были HighGene Transfection reagent (ABclonal), HighGene plus Transfection reagent (ABclonal), GenJector-39 (Molecta), GenJector-40 (Molecta), PEI 40K (Servicebio), PEI MB10000 (Macklin), RapidTrans CHO Kit (Bioengine), Lipomaster293 Transfection Reagent (Vazyme). Для оценки эффективности трансфекции использовали плазмиду pTagGFP2-N vector, флуоресценцию белка GFP в клетках анализировали проточной цитометрией.

Результаты

В результате первичного скрининга по критическим параметрам для дальнейшей разработки технологии отобраны 3 среды — EmCD CHO101, EmCD CHO121, CD CHO050 (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение сред для культивирования

	Тестируемые среды								
Критерий	B600S	B601S	B100S	EmCD CHO101	EmCD CHO121	CD CHO 011	CD CHO 012	CD CHO 050	HiMedia
Скорость удвоения, ч	> 24	24	24	20	21	24	24	24	24
Морфология	Стандартная								Конгломераты
Предельная плотность при культивировании в колбах, кл/мл	4×10^6	8×10^6	8×10^6	1×10^7	9×10^6	5×10^6	4×10^6	5×10^6	8×10^6
Выход из криоконсервации	–	–	–	+	+	–	–	+	–

На основании значений эффективности для последующего анализа влияния трансфектантов на посттрансляционные модификации целевого продукта выбраны 3 системы — RapidTrans CHO Kit, GenJector-39 и PEI 40K (табл. 2).

Определены оптимальные значения таких параметров, как посевная плотность клеток, концентрация ДНК для трансфекции. Данные представлены на графике (рис. 2).

Таблица 2

Эффективность трансфекции

Трансфектант	Полученная эффективность, %
HighGene	18
HighGene plus	1
GenJector-39	24
GenJector-40	2
PEI 40K	22
Полиэтиленамин МВ 10000	0
Rapid Trans CHO Kit	45
Lipomaster 293	0

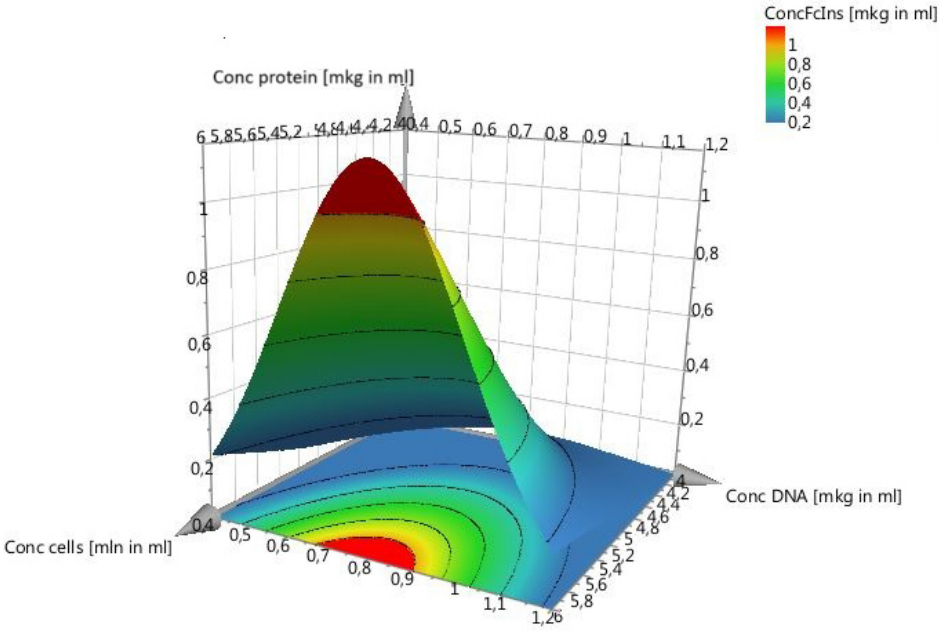


Рис. 2. Зависимость концентрации экспрессируемого белка от варьируемых параметров

Выводы

Таким образом, проведены скрининговые сравнения сред для культивирования клеток и трансфицирующих агентов. По критическим показателям качества для дальнейшей разработки платформенной технологии транзиентной экспрессии в CHO-S выбраны среды EmCD CHO101, EmCD CHO121, CD CHO050 и трансфектанты Rapid Trans CHO Kit, GenJector-39 и PEI 40K. Процесс описан регрессионным уравнением, позволяющим предсказывать оптимальную посевную плотность и концентрацию ДНК.

Литература

1. Fu Y., Han Z., Cheng W. et al. Improvement strategies for transient gene expression in mammalian cells // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2024. Vol. 108, No. 1. P. 480.

2. Zhong X., Ma W., Meade C. L. et al. Transient CHO expression platform for robust antibody production and its enhanced N-glycan sialylation on therapeutic glycoproteins // Biotechnol Prog. 2019. Vol. 35, No. 1. P. 2724.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-85

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ «КОЖА-НА-ЧИПЕ» С БАКТЕРИАЛЬНЫМ КОНСОРЦИУМОМ НА ОСНОВЕ СФЕРОИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КЕРАТИНОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА *

DEVELOPMENT OF SKIN-ON-A-CHIP MODEL WITH A BACTERIAL CONSORTIUM BASED ON SPHEROIDS DERIVED FROM HUMAN KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS

А. В. Кардош[1], П. Ю. Бикмулина[1], Д. О. Голубчиков[1,2], С. В. Цибульников[1], А. И. Шпичка[1], П. С. Тимашев[1]

[1] *Институт регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины Сеченовского университета, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

A. V. Kardosh[1], P. Yu. Bikmulina[1], D. O. Golubchikov[1,2], S. V. Tsibulnikov[1], A. I. Shpichka[1], P. S. Timashev[1]

[1] *Institute for Regenerative Medicine, Biomedical Science & Technology Park, Sechenov University, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ ankardosh@gmail.com

Аннотация

Разработана релевантная модель кожи на основе микрофлюидного чипа с включением бактериального консорциума. В качестве стартового клеточного компонента использовали сфероиды из кератиноцитов и фибробластов. Было показано поддержание жизнеспособности клеток в данной системе, а тест на проницаемость и оценка антибактериальной способности гентамицина позволили подтвердить пригодность модели для тестирования лекарств.

Abstract

A relevant skin model was developed based on a microfluidic chip with the inclusion of a bacterial consortium. Spheroids derived from keratinocytes and fibroblasts were used as the starting cellular component. The system was proved to maintain cell viability, and permeability test along with assessment of gentamicin's antibacterial activity confirmed the model's suitability for drug testing.

Заболевания кожи являются одними из самых распространенных в мире: ими страдает примерно треть населения Земли [1]. В связи с этим создание новых лекарственных средств для применения в дерматологии остается актуальной задачей. Трехмерные модели кожи человека *in vitro* все чаще используют в исследованиях, связанных с разработкой и тестированием препаратов для лечения патологий кожи, а отсутствие этических вопросов, высокая воспроизводимость, возможность масштабирования и относительная простота манипулирования сделали их успешной альтернативой животным моделям [2]. Использование микрофлюидных технологий при создании эквивалентов кожи привело к появлению систем «кожа-на-чипе», представляющих собой новый уровень моделей *in vitro*. Такие модели учитывают не только структурные особенности органа, но и воспроизводят его динамическое микроокружение с помощью тока жидкости по микроканалам, что делает возможным перемещение питательных веществ, метаболитов и газов в системе. Благодаря указанным преимуществам «органы-на-чипе» считаются более физиологически релевантными моделями по сравнению со статичными органотипическими культурами [3]. Однако, несмотря на постоянное усложнение архитектуры и клеточного состава систем «кожа-на-чипе», большинство из них не включает микробиом, присутствие которого необходимо для нормального функционирования нативной кожи. Таким образом, целью данного исследования стала разработка комплексной модели кожи на основе микрофлюидного чипа с добавлением бактериального консорциума.

Сфероиды — шарообразные трехмерные клеточные культуры, которые поддерживают физиологические функции клеток *in vitro*, включая секрецию сигнальных белков, продукцию внеклеточного матрикса и дифференцировку [4]. Поэтому клеточной основой для эквивалента кожи послужили сфероиды, сформированные из кератиноцитов и фибробластов человека двумя разными способами — смешением двух типов клеток и наслоением кератиноцитов на ядро из фибробластов. Бактериальный консорциум состоял из патогенного штамма *Staphylococcus aureus* и комменсального *Staphylococcus epidermidis*. Предварительное сокультивирование консор-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ-БРФФИ «Микрогелевая система доставки терапевтических средств с управляемым высвобождением для лечения ожоговых поражений кожи» (проект № 24-45-10012).

© А. В. Кардош, П. Ю. Бикмулина, Д. О. Голубчиков, С. В. Цибульников, А. И. Шпичка, П. С. Тимашев, 2025

циума со сфероидами показало, что эукариотические клетки поддерживают высокий уровень жизнеспособности, сравнимый с контролем, а метаболическая активность клеток возрастает в сокультуре.

Для формирования модели кожи сфероиды высаживали на мембрану из реконструированного коллагена; в течение 4 дней клетки, мигрируя из состава сфероидов, заселяли ее поверхность. Впоследствии эквивалент кожи переносили в мембранную вставку, встроенную в центральную камеру микрофлюидного чипа из полидиметилсилоксана (PDMS), а в питательную среду засевали бактериальный консорциум. По прошествии 4 дней сокультивирования оценивали жизнеспособность с помощью окрашивания живых/мертвых клеток и лактатдегидрогеназного (ЛДГ) теста, морфологию поверхности эквивалента методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), проводили тест на проницаемость с использованием родамина Б и флуоресцеин-5-изотиоцианата (FITC). Кроме того, на примере гентамицина проверяли применимость модели для тестирования антибактериальных препаратов.

Полученные результаты показали, что клетки из сфероидов эффективно заселяют мембрану и остаются достаточно жизнеспособными после сокультивирования с бактериями в микрофлюидной системе. СЭМ выявила адгезию бактерий к поверхности клеток кожи, что свидетельствует о тесном взаимодействии эукариотической и прокариотической составляющих. Тест на проницаемость и оценка антибактериальной активности гентамицина подтвердили пригодность разработанной модели «кожа-на-чипе» для тестирования лекарственных средств.

Литература

1. Flohr C., Hay R. Putting the burden of skin diseases on the global map // British Journal of Dermatology. 2021. Vol. 184 (2). P. 189–190.

2. Imran M., Moyle P. M., Kamato D., Mohammed Y. Advances in, and prospects of, 3D preclinical models for skin drug discovery // Drug Discovery Today. 2024. Vol. 29 (12). P. 104208.

3. Ismayilzada N., Tarar C., Dabbagh S. R. et al. Skin-on-a-chip technologies towards clinical translation and commercialization // Biofabrication. 2024. Vol. 16 (4).

4. Białkowska K., Komorowski P., Bryszewska M., Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21 (17). P. 6225.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-86

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ СОРТИРОВКИ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ *

DEVELOPMENT OF MICROFLUIDIC SORTING DEVICES FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES AND BIOLOGICAL APPLICATIONS

А. В. Ковалев[1], Г. Р. Туркия[1,2], М. В. Шестаков[1], А. А. Ягодницына[1,2]

[1] *Институт теплофизики им. С. С. Кутателадзе СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

A. V. Kovalev[1], G. R. Turkiya[1,2], M. V. Shestakov[1], A. A. Yagodnitsyna[1,2]

[1] *Kutateladze Institute of Thermophysics SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ therfmig@gmail.com

Аннотация

Микрофлюидные системы сортировки являются перспективным методом для отбора различных биологических объектов в потоке, в том числе сперматозоидов для вспомогательных репродуктивных технологий. Эксперименты и моделирование показали возможность сортировки объектов на 3D-печатном микрофлюидном чипе, а также управления критическим диаметром сортируемых объектов за счет структуры течений.

Abstract

Microfluidic sorting systems are a promising method for selecting various biological objects in flow, including spermatozoa for assisted reproductive technologies (ART). Experiments and modeling have demonstrated the feasibility of sorting objects on a 3D-printed microfluidic chip and controlling the critical sorting diameter of objects through flow structure manipulation.

В последние два десятилетия микрофлюидика, как междисциплинарная наука, стремительно развивается и находит свое применение в таких областях, как биомедицина, фармацевтическая промышленность, медицинская диагностика. Одним из важных направлений является разработка модулей сортировки и разделения различных объектов в потоке. Например, микрофлюидные системы сортировки представляют собой новое поколение методов отбора сперматозоидов в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), а получение функциональных сперматозоидов является первым шагом в лечении бесплодия. Для решения задач ВРТ необходимо иметь микрофлюидные системы сортировки, способные отделять функциональные сперматозоиды от нефункциональных, а также от клеток крови.

Метод детерминированного бокового смещения (DLD) является одним из наиболее перспективных, универсальных и дешевых методов гидродинамической сортировки, который применяется как для твердых сферических частиц, так и для деформируемых объектов сложной формы. DLD-чипы могут быть использованы для сортировки и отбора циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) [1], эритроцитов [2], стволовых клеток [3] и ДНК [4]. Кроме того, недавний прогресс позволяет использовать массивы столбцов DLD в качестве платформы для обнаружения биомолекул, включая белки и везикулы, а также отбора функциональных сперматозоидов [5].

Тем не менее применение и развитие метода DLD ограничено рядом проблем. Например, критический диаметр сортировки D_c, которым определяется характерный размер сортируемых объектов, задаваемый геометрией устройства (размером, формой и расположением столбцов), является фиксированной величиной для конкретного чипа. Другой проблемой является увеличение рабочих объемов и пропускной способности DLD-устройств, что влечет за собой увеличение рабочих чисел Рейнольдса в устройстве. При этом поведение структуры течения в широком диапазоне чисел Рейнольдса и ее влияние на критический диаметр сортировки D_c остаются малоизученными.

В настоящей работе проведено экспериментальное и численное исследование влияния числа Рейнольдса на гидродинамику течения в DLD-чипе при вариации смещения в широком диапазоне чисел Рейнольдса ($0{,}01 < Re < 100$). Для измерения распределений скорости применялся метод micro-PIV (Particle Image Velocimetry). DLD-чипы были изготовлены с помощью фотоплимерной 3D-печати. Для засева потока использовались флуорес-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-79-10291).

© А. В. Ковалев, Г. Р. Туркия, М. В. Шестаков, А. А. Ягодницына, 2025

центные трассеры диаметром 2 мкм. Концентрация частиц в рабочей жидкости составляла 0,017 %. Кроме того, были выполнены 2D-расчеты с использованием прямого численного моделирования в Ansys Fluent.

Результаты расчетов показали, что при малых числах Рейнольдса структура течения слабо зависит от изменения параметра ε, который соответствует тангенсу угла наклона прямой, проведенной через центры столбцов, и, как следствие, определяет относительное смещение рядов столбиков в массиве. С помощью метода micro-PIV получена база экспериментальных данных по полям скорости в DLD-чипах при вариации числа Рейнольдса. Обнаружено, что, как и в случае 2D-моделирования, до значений числа Рейнольдса Re ~ 30–50 возвратных течений между столбцами не возникает. Продемонстрирована возможность сортировки объектов с использованием прототипа DLD-системы, изготовленном с помощью 3D-печати, а также сформулированы дальнейшие шаги по увеличению эффективности сортировки.

Литература

1. Okano H., Konishi T., Suzuki T. et al. Enrichment of circulating tumor cells in tumor-bearing mouse blood by a deterministic lateral displacement microfluidic device // Biomed. Microdevices. 2015. Vol. 17. P. 1–11.

2. Beech J. P., Holm S. H., Adolfsson K., Tegenfeldt J. O. Sorting cells by size, shape and deformability // Lab Chip. 2012. Vol. 12. P. 1048–1051.

3. Xavier M., Holm S. H., Beech J. P. et al. Label-free enrichment of primary human skeletal progenitor cells using deterministic lateral displacement // Lab Chip. 2019. Vol. 19. P. 513–523.

4. Chen Y., Abrams E. S., Boles T. C. et al. Concentrating genomic length DNA in a microfabricated array // Phys. Rev. Lett. 2015. Vol. 114. P. 1–5.

5. Chinnasamy T., Kingsley J. L., Inci F. et al. Guidance and Self-Sorting of Active Swimmers: 3D Periodic Arrays Increase Persistence Length of Human Sperm Selecting for the Fittest // Adv. Sci. 2018. Vol. 5. P. 1700531.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-87

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМ С ГЛУТАТИОНОМ И КОФЕЙНОЙ КИСЛОТОЙ *

ANTIOXIDANT EFFECT OF LIPOSOMES WITH GLUTATHIONE AND CAFFEIC ACID

О. А. Козлова[1,2], В. А. Щелконогов[1,2], А. М. Иншакова[1], Н. С. Шастина[1], Д. И. Прохоров[1], О. А. Баранова[2], А. В. Чеканов[2], Э. Ю. Соловьева[2], А. И. Федин[2]

[1] *МИРЭА — Российский технологический университет, Москва*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*

O. A. Kozlova[1,2], V. A. Shchelkonogov[1,2], A. M. Inshakova[1], N. S. Shastina[1], D. I. Prokhorov[1], O. A. Baranova[2], A. V. Chekanov[2], E. Yu. Solovyova[2], A. I. Fedin[2]

[1] *MIREA — Russian Technological University, Moscow*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

✉ olenkakozl0w4@yandex.ru

Аннотация

Была оценена антиоксидантная активность липосом с глутатионом (GSH), кофейной кислотой (CA) и их комбинацией на модельных системах стабильного DPPH-радикала и нейтрофилов, активированных форбол-12-меристат-13-ацетатом (ФМА). Показано, что наночастицы (НЧ), содержащие комбинацию CA и GSH, проявляют наиболее выраженный антиоксидантный эффект.

Abstract

The antioxidant activity of liposomes with glutathione (GSH), caffeic acid (CA) and their combination was assessed on model systems of stable DPPH-radical and neutrophils activated by phorbol-12-meristate-13-acetate. It has been shown that nanoparticles containing combination of GSH and CA exhibit the most pronounced antioxidant effect.

Сосудистые заболевания головного мозга являются наиболее распространенными формами патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов. Основные патогенетические механизмы развития инсульта включают возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов и др. [1]. Повышенный уровень свободных радикалов вследствие дисбаланса антиоксидантной и прооксидантной систем является основным повреждающим фактором при ишемическом инсульте. Избыточное образование активных форм кислорода (АФК) и азота приводит к повреждению таких клеточных структурных компонентов, как липиды, нуклеиновые кислоты, белки; повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера, активации медиаторов воспаления и др. Поэтому при комплексной терапии данной патологии необходимо применять препараты, проявляющие антиоксидантное и антиагрегантное действие. Одними из перспективных антиоксидантов являются глутатион и кофейная кислота.

Целью научной работы является оценка антиоксидантных свойств липосом с GSH, CA и их комбинацией на модельных системах.

Ранее были получены липосомы с исследуемыми антиоксидантами, характеризующиеся медленным высвобождением активных веществ из НЧ и высокой дисперсионной стабильностью при их длительном хранении [2].

Антиоксидантную активность липосом с GSH, CA и их комбинацией определяли по их способности к ингибированию стабильного свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH). В проведенном тесте было показано, что липосомы с АО в минимальной (GSH 0,2 мМ, CA 0,55 мМ) и максимальной (GSH 0,4 мМ, CA 1,1 мМ) исследуемых концентрациях эффективно нейтрализуют DPPH-радикал, причем значения процента ингибирования для всех образцов липосом были близки и составляли 85–97 %. Наиболее выраженным антиоксидантным действием обладали липосомы с комбинацией АО. Следует отметить, что липосомы без антиоксидантов и водные растворы с АО ингибировали DPPH-радикал примерно на 53–65 %.

* Исследование выполнено при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «Базис» (грант № 22-1-1-28-1).

© О. А. Козлова, В. А. Щелконогов, А. М. Иншакова, Н. С. Шастина, Д. И. Прохоров, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, 2025

Одними из форменных элементов крови являются нейтрофилы, способные генерировать АФК в присутствии различных активаторов. В данной работе оценивалось антиоксидантное действие липосом с GSH, CA и их комбинацией на активированных нейтрофилах в сравнении с водными растворами активных субстанций и «пустых» липосом. В качестве активатора нейтрофилов использовали ФМА.

Было установлено, что добавление ФМА к нативным нейтрофилам (контроль) приводило к повышению интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции НФ по сравнению с нативными клетками. В свою очередь, добавление липосом с GSH (0,2–0,4 мМ), CA (0,6–1,1 мМ) и их комбинацией вызывало значительное уменьшение (в 5–80 раз) интенсивности хемилюминесценции, обусловленной генерацией активных форм кислорода в НФ, активированных с помощью ФМА. Наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладали НЧ, содержащие комбинацию GSH и CA. Водные растворы исследуемых АО также продемонстрировали антиоксидантный эффект в данной биологической модели, снизив концентрацию АФК приблизительно в 3–3,2 раза.

Таким образом, липосомы с GSH, CA и их комбинацией — перспективные кандидаты для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vivo*.

Литература

1. Inshakova A. M., Shchelkonogov V. A. et al. Antioxidant and antiplatelet effect of nanodispersions with conjugate of glutathione and lipoic acid // Mendeleev Communications. 2024. Vol. 34. P. 887–889.

2. Козлова О. А., Щелконогов В. А. и др. Антиоксидантные свойства наночастиц с кофейной кислотой и глутатионом // XI Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины. 2024. С. 287–288.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-88

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОРИСТЫХ БИОПОЛИМЕРНЫХ КАРКАСОВ МЕТОДОМ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

FORMIMG POROUS BIOPOLYMER SCAFFOLDS BY LEACHING FOR TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE

А. А. Комаров, А. Е. Дудаев, Е. И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет, Красноярск

A. A. Komarov, A. E. Dudaev, E. I. Shishatskaya

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

✉ komarovart911@gmail.com

Аннотация

В данной работе представлено исследование по разработке пористых биополимерных каркасов из П3ГБ и его сополимера с П3ГБ/3ГВ методом литья из растворителя и выщелачивания твердых частиц. Исследовано влияние размера частиц и типа порообразователя (NaCl, сахароза). Результаты показали, что каркасы из П3ГБ и сахарозы в качестве порообразователя ведут к большему влагопоглощению, а П3ГБ/3ГВ и NaCl повышают гидрофильность поверхности.

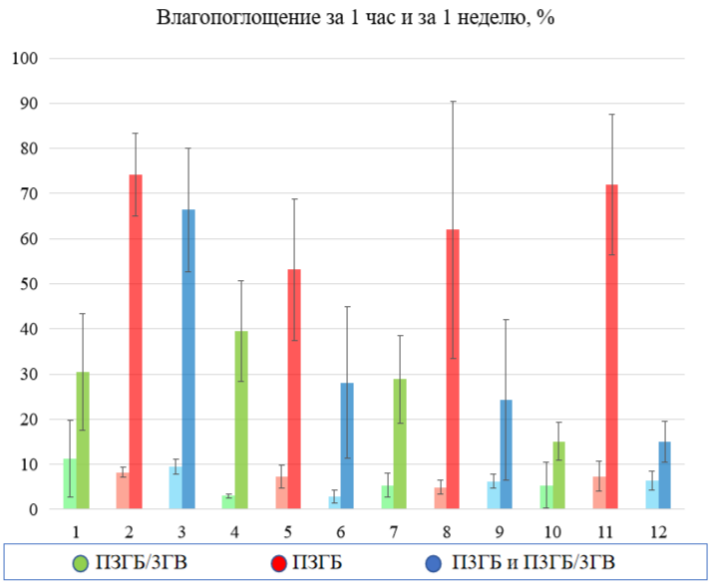
Abstract

This study presents the development of porous biopolymer scaffolds made of P3HB and its copolymer with P3HB/3HV using solvent casting and particulate leaching method. The influence of particle size and type of porogen (NaCl, sucrose) was investigated. The results showed that scaffolds made of P3HB and sucrose as a porogen lead to greater water absorption, while P3HB/3HV and NaCl increase the hydrophilicity of the surface.

Введение

Тканевая инженерия — это междисциплинарная область, в которой используются клетки, биоматериалы, биохимические сигналы, например факторы роста и физические сигналы, например механическая нагрузка. А также их комбинации для создания тканеподобных структур.

Цель тканевой инженерии — создание биологических заменителей, способных поддерживать, восстанавливать или улучшать функции поврежденных тканей, а также создание тканевых структур для исследований *in vitro*.



Показатели влагопоглощения образцов

Материалы и методы

Объектом исследования были биополимеры поли(3-гидроксибутират) (П3ГБ) и сополимер поли(3-гидроксибутирата) с поли(3-гидроксивалератом) (П3ГБ/3ГВ). Биополимеры были получены в лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ. В качестве растворителя использовался хлороформ. В качестве порообразователей были использованы хлорид натрия (NaCl) и сахароза ($C_{12}H_{22}O_{11}$).

Методика работы заключалась в растворение П3ГБ и П3ГБ/3ГВ в хлороформе при 50 °С с получением 10%-х растворов биополимеров. Полученные растворы охлаждали до комнатной температуры. Затем вносили 15 % по массе биополимера NaCl или сахарозы (фракции 40–63 и 80–100 мкм). Скаффолды были сформированы путем отливки 40 мл раствора в чашки Петри (d = 6 см) и последующим высушиванием в вытяжном шкафу.

© А. А. Комаров, А. Е. Дудаев, Е. И. Шишацкая, 2025

Выщелачивание производилось погружением образцов в дистиллированную воду при 75 °С. Смена дистиллированной воды происходила каждый час. Выщелоченные образцы сушились 24 ч при 60 °С. Окончательный этап подготовки характеризовался нарезкой на фрагменты S = 1 см (для анализа влагопоглощения) и на полоски 1 × 5 см (для анализа гидрофильности).

Анализ способности поглощать воду проводился путем экспозиции образца в дистиллированной воде. Измерения массы производились спустя 1 ч и спустя 7 сут нахождения в воде. Результаты представлены в табл. 1 и 2 и на рисунке.

Таблица 1

Показатели влагопоглощения образцов

Образец	Порообразователь	Влагопоглощение за 1 ч, %	Влагопоглощение за 7 сут, %
ПЗГБ/ЗГВ	NaCl 80–100	11,31 ± 8,5	30,55 ± 12,93
ПЗГБ	NaCl 80–100	8,27 ± 1,19	74,18 ± 9,19
ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50 : 50)	NaCl 80–100	9,4 ± 1,67	66,34 ± 13,72
ПЗГБ/ЗГВ	NaCl 40–63	3,08 ± 0,44	39,57 ± 11,13
ПЗГБ	NaCl 40–63	7,3 ± 2,45	53,15 ± 15,67
ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50 : 50)	NaCl 40–63	2,89 ± 1,41	28,09 ± 16,76
ПЗГБ/ЗГВ	Сахароза 80–100	5,34 ± 2,64	28,81 ± 9,73
ПЗГБ	Сахароза 80–100	4,92 ± 1,56	61,98 ± 28,45
ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50 : 50)	Сахароза 80–100	6,22 ± 1,55	24,26 ± 17,7
ПЗГБ/ЗГВ	Сахароза 40–63	5,34 ± 5,11	15,05 ± 4,22
ПЗГБ	Сахароза 40–63	7,34 ± 3,28	71,97 ± 15,47
ПЗГБ + ПЗГБ/ЗГВ (50 : 50)	Сахароза 40–63	6,39 ± 2	21,3 ± 4,52

Таблица 2

Значения краевых углов смачивания и поверхностной энергии полученных скаффолдов

№	Контактный угол смачивания		Общее поверхностное натяжение	Дисперсия поверхностного натяжения	Полярность поверхностного натяжения
	Вода	Дийодометан			
1	65,4 ± 3,9	47,6 ± 4,8	47 ± 1,5	35,6 ± 1	11,4 ± 0,5
2	76,4 ± 9,9	60,4 ± 7,8	36,6 ± 2,2	28,3 ± 1,4	8,3 ± 0,8
3	104,8 ± 9	N/A	N/A	N/A	N/A
4	58,7 ± 9,4	47,4 ± 4,7	50,9 ± 1,9	35,7 ± 1	15,1 ± 0,9
5	74,2 ± 2,6	69 ± 6,3	34,7 ± 1,6	23,4 ± 1,1	11,3 ± 0,5
6	61,3 ± 5,8	57,3 ± 6	46,1 ± 1,9	30,1 ± 1,1	16 ± 0,7
7	83,9 ± 10,4	59,3 ± 4,9	33,8 ± 1,5	29 ± 0,9	4,8 ± 0,5
8	72 ± 3,3	57,9 ± 9,2	39,8 ± 2,4	29,8 ± 1,7	10 ± 0,7
9	59,8 ± 8,8	41,1 ± 9,7	52,3 ± 3,14	39,1 ± 2,1	13,3 ± 1
10	83,8 ± 7,8	N/A	N/A	N/A	N/A
11	88,3 ± 4,9	26,1 ± 16,8	46,7 ± 4,3	45,8 ± 4	0,9 ± 0,3
12	85,5 ± 3,3	61,5 ± 5,8	32,3 ± 1,4	27,7 ± 1,1	4,5 ± 0,3

Заключение

На основе результатов исследования можно сделать следующие выводы.

1. Скаффолды, изготовленные из ПЗГБ, демонстрируют наибольшую способность к влагопоглощению, равную 6,96 ± 1,5 % (спустя 1 ч) и 65,3 ± 9,6 % (спустя 1 нед).

2. Скаффолды из ПЗГБ/ЗГВ продемонстрировали меньшие значения влагопоглощения: 6,27 ± 3,3 % (1 ч) и 28,5 ± 9,8 % (1 нед).

3. Смешанные из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ скаффолды продемонстрировали промежуточный показатель в 35 ± 20 %.

4. Сахароза в качестве порообразователя давала наибольшие значения способности влагопоглощения образца.

5. Наиболее гидрофильными были образцы, полученные методом выщелачивания с помощью NaCl в качестве порообразователя и ПЗГБ/ЗГВ в качестве основы скаффолда.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-89

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА РАЗВИТИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР *

ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF SOIL PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ON CROP DEVELOPMENT

Б. С. Кондрашов[1,2], Е. С. Трубников[3], К. А. Донцова[1], М. И. Пчелинцев[4], С. Е. Седых[1,2]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[3]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[4]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*

B. S. Kondrashov[1,2], E. S. Trubnikov[3], K. A. Dontsova[1], M. I. Pchelintsev[4], S. E. Sedykh[1,2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[3]*Lomonosov Moscow State University*
[4]*Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ boris.kondrashov.biology@gmail.com

Аннотация

Одним из перспективных способов повышения плодородия почв является использование бактерий, стимулирующих рост и развитие растений. Показано, что бактериальные культуры *Pseudomonas fluorescens, Stenotrophomonas maltophilia, Bacillus megaterium* благоприятно влияют на экспрессию генов, кодирующих важные для роста и развития кукурузы, подсолнечника и гороха белки: rbcS, PEPC1, ME.

Abstract

One of the promising ways to increase soil fertility is the use of plant growth promoting bacteria. It has been shown that bacterial cultures of *Pseudomonas fluorescens, Stenotrophomonas maltophilia, Bacillus megaterium* have a beneficial effect on the expression of key plant genes rbcS, PEPC1, ME important for growth and development of corn, sunflower and pea.

Минеральные удобрения традиционно используют для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, однако их несбалансированное внесение может приводить к нарушению физико-химических процессов, происходящих в почве [1]. Применение почвенных бактерий в качестве биоудобрений может стать альтернативой внесению неорганических удобрений и повысить эффективность сельского хозяйства.

Почвенные бактерии, стимулирующие рост растений, напрямую или косвенно увеличивают доступность питательных веществ и способствуют их достаточному поступлению к растениям-хозяевам. Такие бактерии усиливают рост растений и улучшают плодородие почвы в результате фиксации атмосферного азота, солюбилизации нерастворимых соединений фосфора, изменения уровня фитогормонов или ингибирования патогенов растений [2]. Показано, что создание биоудобрений для внесения в почву требует подбора оптимальных штаммов, подходящих для конкретных культур [3].

В данной работе использовали бактериальные культуры *Pseudomonas fluorescens, Stenotrophomonas maltophilia, Bacillus megaterium* и растения гороха, подсолнечника и кукурузы. Способность к азотфиксации была обнаружена у бактерий *P. fluorescens, B. megaterium и S. maltophilia* при помощи культивирования на безазотной среде Эшби. Было показано, что бактерии *P. fluorescens*, *B. megaterium* способны переводить в растворимое состояние неорганический фосфат на Pi среде. Также у всех бактерий была обнаружена секреция сидерофоров на среде, содержащей хромазурол S.

Бактерии были проанализированы методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени на содержание генов, отвечающих за секрецию сидерофоров, нитрификацию (amoA), солюбилизацию фосфатов (bpp, phy), секрецию ауксина (asdSF, ipdC), генов нитрогеназ. Ген, ответственный за секрецию сидерофоров, обнаружен

* Исследование выполнено в рамках соглашения № 075-15-2025-473.

Авторы благодарят команду школьников — участников проекта «Анализ влияния почвенных бактерий, стимулирующих рост растений, на развитие с/х культур» научно-технологической проектной образовательной программы «Большие вызовы» за творческий вклад в реализацию проекта.

© Б. С. Кондрашов, Е. С. Трубников, К. А. Донцова, М. И. Пчелинцев, С. Е. Седых, 2025

у *P. fluorescens* и *B. megaterium*. Ген AmoA, кодирующий аммиачную монооксигеназу, присутствует у *P. fluorescens* и *B. megaterium*. Все изученные бактерии имеют гены, ответственные за секрецию ауксинов. *P. fluorescens, S. maltophilia, B. megaterium* имеют гены, кодирующие нитрогеназу, и обладают способностью к азотфиксации. Все бактерии, за исключением *S. maltophilia*, имеют фосфато-солюбилизирующую активность (ген bpp — бета-пропеллер фитаза).

Для изучения влияния бактерий на рост и развитие сельскохозяйственных культур методом ΔΔCt проводили анализ изменения уровня экспрессии генов rbcS, PEPC1, ME, продукты которых принимают участие в основных метаболических путях растений, а также анализировали данные морфометрии растений. Выраженное положительное влияние на рост кукурузы оказала культура *P. fluorescens* с увеличением длины побега на 77,9 % по сравнению с контролем ($p < 0{,}01$). На уровень экспрессии генов rbcS, PEPC1 в листе кукурузы положительное влияние оказали *P. fluorescens* и *B. megaterium*. Статистически значимое положительное влияние на рост гороха оказала инокуляция культурой *B. megaterium* с увеличением длины побега в 3,3 раза ($p < 0{,}01$). В листьях проростков данного сорта на экспрессию гена rbcS положительное влияние оказывает внесение культуры *P. fluorescens*. Было показано, что все культуры бактерий оказывают положительное влияние на экспрессию генов rbcS, PEPC1 в листе подсолнечника. При этом в образцах, инокулированных *S. maltophilia*, изменение уровня экспрессии обоих генов значительно выше по сравнению с контролем.

Литература

1. Pahalvi H. N. et al. Chemical fertilizers and their impact on soil health // Microbiota and biofertilizers. Vol. 2: Ecofriendly tools for reclamation of degraded soil environs. Cham: Springer International Publishing, 2021. P. 1–20.

2. Mahanty T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development // Environmental Science and Pollution Research. 2017. Vol. 24, No. 4. P. 3315–3335.

3. Kumar R., Kumawat N., Sahu Y. K. Role of biofertilizers in agriculture // Popular kheti. 2017. Vol. 5, No. 4. P. 63–66.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-90

ИССЛЕДОВАНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ И ОЦЕНКА БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *

STUDY OF ADHESIVE PROPERTIES AND ASSESSMENT OF BIOFILM-FORMING ABILITY OF LACTIC ACID BACTERIA

О. Д. Корноухова, Д. А. Тимкачев, Тхи Ту Нгог Ле, Б. А. Кареткин, Н. Ю. Хромова

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

O. D. Kornoukhova, D. A. Timkachev, Thi Tu Ngog Le, B. A. Karetkin, N. Yu. Khromova

D. I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow

✉ khromova.n.i@muctr.ru

Аннотация

Поиск способов повышения стабильности лактобактерий — актуальная задача в пищевой и фармацевтической промышленности. В работе приведены результаты изучения адгезивных свойств молочнокислых бактерий — аутоагрегации, гидрофобности клеточной поверхности, необратимой адгезии к твердым носителям — с целью оценки способности к биопленкообразованию. Показано, что штаммы *L. plantarum* обладали наибольшей гидрофобностью и формировали биопленки на стекле.

Abstract

Finding the ways to improve the stability of lactobacillus is a critical issue in the food and pharmaceutical industries. This paper presents the results of a study on the adhesive properties of lactic acid bacteria, including autoaggregation and hydrophobicity on the cell surface and irreversible adhesion to solid substrates, in order to evaluate the potential for biofilm formation as a means of increasing resistance. It has been demonstrated that *L. plantarum* strains exhibit the highest hydrophobicity and form biofilms on glass surfaces.

Биопленки — структурированное сообщество микроорганизмов, характеризующееся высокой устойчивостью к внешним воздействиям, формирование которого рассматривается как природный механизм выживания бактерий в неблагоприятных условиях [1]. Исследование биопленок преимущественно осуществлялось в отношении патогенных микроорганизмов, однако в последнее время проводится поиск биопленкообразующих штаммов среди лакто- и бифидобактерий для создания инновационных заквасок и пробиотиков с повышенной стабильностью. Для пробиотиков наличие способности образовывать биопленки рассматривается как возможность повышения их выживаемости в условиях желудочно-кишечного тракта и колонизации кишечника, где важными характеристиками являются адгезивные свойства, такие как аутоагрегация, гидрофобность клеточной поверхности, коагрегация, а также необратимая адгезия к твердым поверхностям [1, 2].

Таким образом, целью работы являлось изучение адгезивных характеристик штаммов рода *Lactobacillus* и *Streptococcus* и оценка их потенциала к формированию биопленок.

В качестве исследуемых культур выступали штаммы *S. thermophilus* B-3386, B-3809, B-4463, *L. plantarum* B-5145, B-3960 и *L. bulgaricus* B-5004, B-2746, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Россия).

Способность к аутоагрегации определяли согласно методике, описанной Collado et al. (рис. 1, *а*) [3]. Определение гидрофобности клеточной поверхности проводили согласно Vinderola et al. с использованием неполярного растворителя — гексана (см. рис. 1, *б*) [4].

Результаты показали, что рассмотренные штаммы обладали высокой способностью к аутоагрегации (спустя 24 ч инкубации она составила более 25 %). Наилучшую способность к аутоагрегации продемонстрировали штаммы B-2746 (71 %), B-3386 (44 %) и B-3809 (43 %). Умеренной аутоагрегацией характеризовались штаммы B-5145 (36 %) и B-5004 (36 %). Наибольшей гидрофобностью клеточной поверхности, значение которой было в 2 раза выше по сравнению с другими культурами, характеризовались штаммы *L. plantarum* B-5145 и B-3960 (см. рис. 1, *б*).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-76-10063).

© О. Д. Корноухова, Д. А. Тимкачев, Тхи Ту Нгог Ле, Б. А. Кареткин, Н. Ю. Хромова, 2025

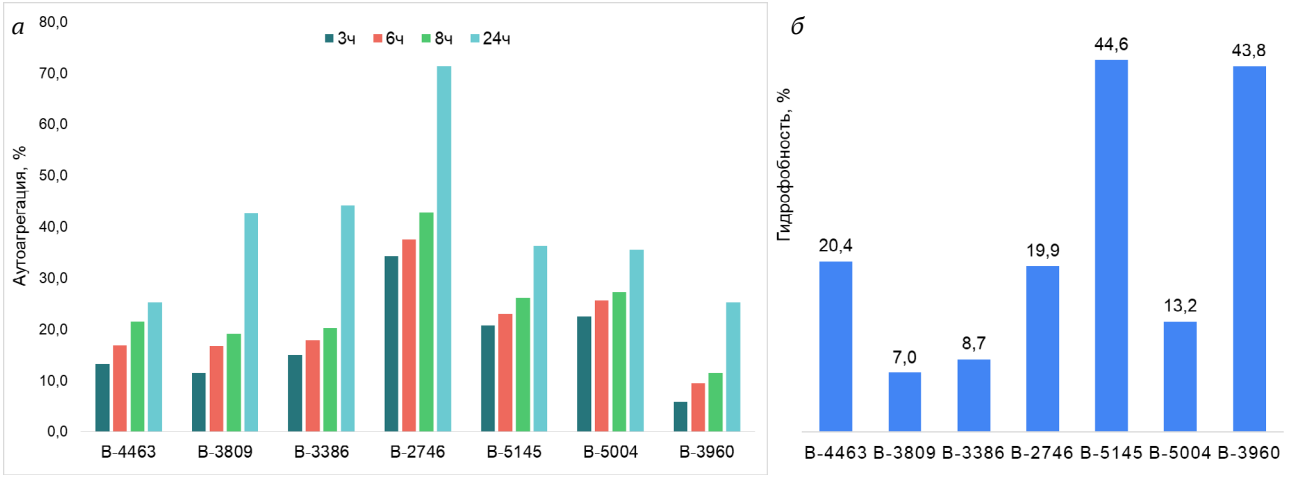


Рис. 1. Процент аутоагрегации (*а*) и гидрофобности клеточной поверхности (*б*) лактобактерий

Для исследования необратимой адгезии клеток молочнокислых бактерий к твердой поверхности исследовали образование биопленок на предметных стеклах через 24 (рис. 2, *а–г*) и 48 ч (рис. 3, *а–г*) инкубации при 37 °С [5] методом фазово-контрастной микроскопии (100×).

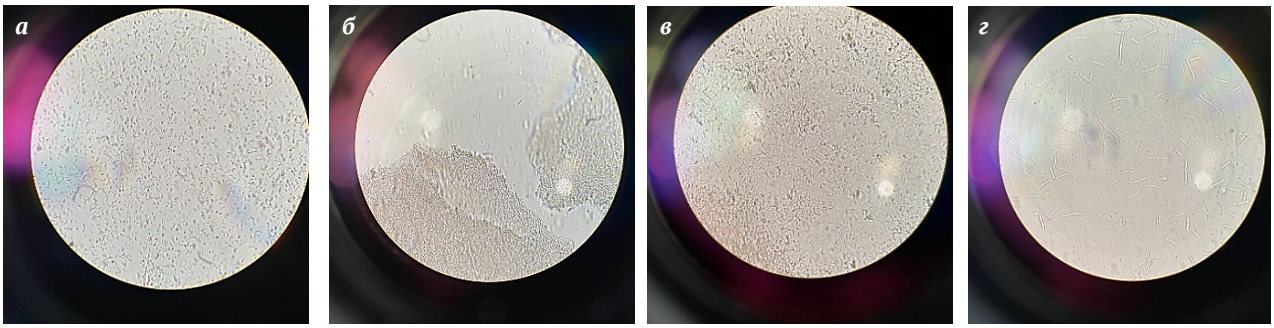


Рис. 2. Структура биопленок через 24 ч инкубации при 37 °С:
а — В-3960, *б* — В-5145, *в* — В-5004, *г* — В-2746. Микроскопия с ФК, объектив 100×

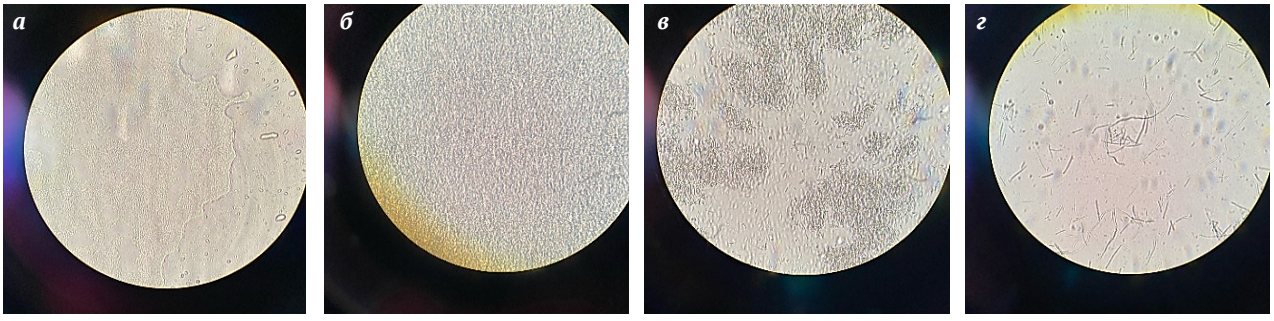


Рис. 3. Структура биопленок через 48 ч инкубации при 37 °С:
а — В-3960, *б* — В-5145, *в* — В-5004, *г* — В-2746. Микроскопия с ФК, объектив 100×

Установлено, что штаммы В-5145 и В-5004 начинали образовывать биопленки на стекле уже после 24 ч инкубации (см. рис. 2, *б, в*). При этом биопленки характеризовались достаточно плотной структурой и близким расположением клеток друг к другу. Через 48 ч инкубации такую же структуру на стекле образовывал штамм В-3960 (см. рис. 3, *а*).

В дальнейших исследованиях планируется расширить перечень штаммов и диапазон значений продолжительности инкубации, а также изучить формирование биопленок на полистирольных материалах.

Литература

1. Захарова Ю. В. и др. Изучение *in vitro* влияния ДНК пробиотического штамма *Bifidobacterium bifidum* на количественный уровень и колонизационные свойства кишечных микросимбионтов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. №. 5. С. 424–430.

2. Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products // International Dairy Journal. 2005. Vol. 15, No. 12. P. 1289–1297.

3. Collado M. C., Meriluoto J., Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains // Eur. food Res. Technol. Springer. 2008. Vol. 226, No. 5. P. 1065–1073.

4. Vinderola C. G., Medici M., Perdigon G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria // J. Appl. Microbiol. Wiley Online Library. 2004. Vol. 96, No. 2. P. 230–243.

5. Семченко А. А., Рябцева С. А. Исследование процессов образования биопленок *Streptococcus Thermophilus* // Матлы IX Междунар. науч.-практ. конф. «Современные достижения биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» и конф. «Инновационные биотехнологии природных и синтетических биологически активных веществ. Нарочанские чтения — 16». Ставрополь: СКФУ, 2024. С. 325–327.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-91

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕПОЛИМЕРИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОЛИМЕРНОГО ИСТОЧНИКА

EVALUATION OF POTENTIAL DEPOLYMERIZING ACTIVITY OF MICROBIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM POLYMERIC SOURCE

А. С. Коснырев, А. В. Петров, Р. В. Юсупов, В. В. Ульянова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

A. S. Kosnyrev, A. V. Petrov, R. V. Yusupov, V. V. Ulyanova

Kazan Federal University

✉ s_kosnyrev@mail.ru

Аннотация

Проблема утилизации пластмасс актуальна из-за недостатка биосовместимых подходов. Данное исследование нацелено на поиск микроорганизмов, разлагающих полимеры. Из системы водоснабжения изолирован консорциум микробов из семейства *Bacillaceae*. По данным эллипсометрии, инкубация консорциума с полимерными изделиями на минимальной среде привела к снижению толщины части образцов, что отражает потенциальную деполимеризующую активность бактерий.

Abstract

Plastic utilization remains the relevant problem due to the lack of biocompatible approaches. This work is aimed at the search of polymer-degrading microorganisms. A microbial consortium from *Bacillaceae* family was isolated from the water supply system. According to ellipsometry, incubation of consortium with polymeric products on the minimal medium decreased the thickness of some samples, which demonstrates the potential depolymerizing activity of bacteria.

Загрязнение окружающей среды пластмассами — одна из основных проблем современности, выражающаяся не только в нанесении ущерба экосистемам, но и в создании экономической нагрузки на инфраструктуру. Существующие методы утилизации и переработки полимеров имеют ограниченный круг применения, поэтому актуальной становится разработка подходов, основанных на использовании микроорганизмов — деструкторов полимерных материалов, в связи с этим целью данной работы стало определение потенциальной способности к разрушению пластмасс у микробного консорциума, выделенного с поверхности полимерного материала.

В качестве источника микроорганизмов была выбрана силиконовая трубка из системы водоснабжения с признаками микробного загрязнения на внутренней поверхности. Смыв с полученного образца обогащали на среде LB и затем пересевали в соотношении 1 : 50 на минеральную среду M9, в которой источниками углерода выступали прозрачные пленки массой 20 мг из различных видов пластмасс: полиэтилентерефталата (ПЭТ), полипропилена (ПП) и полиэтилена высокой плотности (ПЭВП), в качестве контроля использовали неинокулированную стерильную среду с образцами пленок. Инкубацию образцов проводили при 37 °C и 160 об/мин в течение 4 недель с заменой среды спустя 2 недели после инокуляции. После инкубации пленки очищали от микробного налета однократным промыванием 1%-м додецилсульфатом натрия в течение 5 мин, однократным промыванием дистиллированной водой в течение 5 мин, трехкратным промыванием 70%-м этанолом в течение 5 мин и однократным промыванием дистиллированной водой в течение 5 мин, а затем высушивали на воздухе в течение суток. Для оценки степени разрушения полимеров определяли толщины отмытых пленок на эллипсометре Woollam VASE (J.A. Woollam Co., Inc., США) путем измерения интенсивности отраженного от пленок света как функции угла падения в диапазоне от 39° до 53° на длине волны 800 нм. В измеренных зависимостях проявлялась последовательность максимумов и минимумов, обусловленная интерференцией отраженных от двух поверхностей пленок компонент. Далее определялись углы, соответствующие интерференционным максимумам, и с использованием известного выражения $d = \frac{\lambda}{2\left(\sqrt{n^2 - \sin^2\alpha} - \sqrt{n^2 - \sin^2\beta}\right)}$ вычислялась толщина пленки и оценивалась погрешность полученного значения. В представленном выше выражении d — толщина пленки в мкм, λ — длина волны в мкм, n — показатель преломления материала при заданной длине волны, α и β — углы двух соседних

© А. С. Коснырев, А. В. Петров, Р. В. Юсупов, В. В. Ульянова, 2025

интерференционных максимумов. Из полученных значений для набора пар соседних интерференционных максимумов брали среднее арифметическое и вычисляли изменение толщины относительно контроля по формуле $\frac{d_o - d_к}{d_к} \times 100$, где $d_о$ — толщина обработанной микроорганизмами пленки, $d_к$ — толщина контрольного образца.

Для предварительного определения систематической принадлежности микроорганизмов в консорциуме были получены чистые культуры путем серийных разведений, затем изоляты окрашивали методом Грама и Шеффера — Фултона и микроскопировали на увеличении 1600×, также был проведен каталазный тест. Таксономическую принадлежность определяли согласно справочнику Бёрджи по бактериологической систематике.

Было установлено, что инкубация консорциума с пленками из ПЭТ и ПЭВП уменьшает их толщину на 5 и 4 % соответственно, в то время как толщина пленки из ПП, наоборот, была увеличена на 3,9 %. Из исследуемого консорциума были выделены 4 изолята, микроскопия показала, что микроорганизмы являются грамположительными спорообразующими палочками, каждая из которых обладала каталазной активностью, что позволяет отнести их к семейству *Bacillaceae*. Таким образом, было показано, что консорциум, выделенный из источника с признаками микробного загрязнения, обладает потенциалом к биодеструкции по отношению к некоторым видам пластмасс и представляет интерес в качестве платформы для дальнейшей разработки средств утилизации труднодоступных соединений.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-92

СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ ТЕРЕФТАЛАТА

MODERN BIOTECHNOLOGIES FOR TEREPHTHALATE RECYCLING

К. А. Кочукова, А. А. Кузьмицкая, С. В. Калёнов

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

K. A. Kochukova, A. A. Kuzmitskaya, S. V. Kalenov

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

✉ kuzmichwolf@gmail.com

Аннотация

Мировое научное сообщество достигло значительного прогресса в области микробиологической переработки мономеров полиэтилентерефталата. В данной работе рассмотрены особенности метаболизма терефталата в клетках микроорганизмов, а также приведены примеры современных исследований в области технологий биоконверсии терефталата в продукты с добавленной себестоимостью.

Abstract

The global scientific community has made significant progress in the field of microbiological processing of polyethylene terephthalate monomers. This work examines the features of terephthalate metabolism in microorganism's cells and provides the examples of modern researches in the field of terephthalate bioconversion into value-added products.

В эпоху глобализации пластик стал неотъемлемой частью повседневной жизни человечества. Полиэтилентерефталат (ПЭТ) является одним из самых широко распространенных пластиковых материалов на планете, который используется в различных отраслях промышленности при изготовлении упаковочных материалов, нитей, контейнеров и емкостей для напитков. Увеличивающиеся масштабы производства полиэтилентерефталата приводят к образованию огромного количества бытовых пластиковых отходов, большая часть которых не перерабатывается в дальнейшем. В последние годы, с ростом экологического сознания, переработка полимерных отходов в продукты с добавленной себестоимостью стала одной из актуальных тем ведущих научных исследований [1, 2].

Одним из методов вторичной переработки полиэтилентерефталата является его химическая деполимеризация посредством гидролиза. В процессе гидролиза образуются ароматические мономеры (например, терефталевая кислота, динатриевый терефталат) и этиленгликоль, которые могут использоваться различными микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии. Такие соединения обладают значительно большей биодоступностью, чем исходный пластиковый субстрат, поэтому, с целью достижения большей эффективности реализации концепций экономики замкнутого цикла, химическая деполимеризация может быть интегрирована в различные биологические системы для вторичной переработки пластиковых отходов [3].

Метаболические пути биодеградации терефталата достаточно хорошо изучены и описаны. Терефталевая кислота (ТФК) может превращаться в протокатехоат (ПКК) с помощью ферментов диоксигеназы TphA1A2A3 и дегидрогеназы TphB. Диоксигеназа катализирует превращение ТФК в 1,6-дигидроксициклогекса-2,4-диендикарбоксилат (ДКД), а дегидрогеназа обуславливает превращение ДКД в ПКК. В дальнейшем ПКК метаболизируется по одному из трех протокатехоатных путей (мета-, орто- или пара-расщепление), в результате чего образуются соединения, которые перерабатываются центральным клеточным метаболизмом либо по β-кетоадипатному пути, либо через цикл трикарбоновых кислот [4]. Также в процессе расщепления терефталата могут быть задействованы фталатный и бензоатный метаболические пути, которые приводят к образованию ПКК и катехола [5].

Современные биотехнологии переработки терефталатов основаны на сочетании инновационных подходов в области синтетической микробиологии и метаболической инженерии. В недавних исследованиях была описана технология получения биоразлагаемых полимеров полигидроксиалканоатов (ПГА) из мономеров, образующихся при гидролизе ПЭТ-пленок. Синтез ПГА осуществлялся в процессе культивирования генетически модифицированного штамма *Pseudomonas umsongensis* GO16 на гидролизате, содержащем терефталат и этиленгликоль в качестве источников углерода. Дополнительные модификации данного штамма позволили также получать секретируемые вещества, которые используются в качестве мономеров при химико-каталитическом синтезе полиамидоуретана [6].

© К. А. Кочукова, А. А. Кузьмицкая, С. В. Калёнов, 2025

Модифицированный штамм *Pseudomonas putida* KT2440 способен не только использовать ТФК и бисгидроксиэтилтерефталат (БГЭТ) в качестве единственных источников углерода, но и трансформировать БГЭТ в β-кетоадипиновую кислоту — мономер, который может быть полимеризован в аналог нейлона-6,6 с улучшенными эксплуатационными характеристиками [7].

Сочетание щелочного гидролиза ПЭТ и микробиологической системы культивирования генно-инженерного штамма *Rhodococcus jostii* стало основой гибридной стратегии конверсии ПЭТ-мономеров в ликопин — ценный каротиноид, обладающий антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. При этом продукция ликопина увеличилась в 500 раз, по сравнению с исходным штаммом дикого типа [8].

Разработаны рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, обеспечивающие метаболические пути превращения ТФК в галловую кислоту, пирогаллол, катехол, муконовую кислоту и ванилиновую кислоту [9]. Также разработана полиферментная каскадная система для биоконверсии ТФК в ванилин в клетках *E. coli*. Для увеличения синтеза ванилина использовались методы метаболической инженерии, включающие ингибирование деградации ванилина и усиление поглощения ТФК с помощью модификаций мембранных белков для повышения проницаемости клеточных стенок бактерий [10].

Методы биоинженерии позволяют создавать микроорганизмы, способные к катаболизму терефталатов с образованием ценных химических соединений для промышленного применения.

Литература

1. Ghosal K., Nayak C. Recent advances in chemical recycling of polyethylene terephthalate waste into value added products for sustainable coating solutions — hope vs. hype // Materials Advances. 2022. Vol. 3, No. 4. P. 1974–1992.

2. Chowdhury T. U., Mahi M. A., Haque K. A., Rahman M. M. A review on the use of polyethylene terephthalate (PET) as aggregates in concrete // Malaysian Journal of Science. 2018. Vol. 37, No. 2. P. 118–136.

3. Schaerer L. et al. Coexistence of specialist and generalist species within mixed plastic derivative-utilizing microbial communities // Microbiome. 2023. Vol. 11, No. 1.

4. Dissanayake L., Jayakody L. N. Engineering microbes to bio-upcycle polyethylene terephthalate // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. Vol. 9.

5. Patrauchan M. A. et al. Catabolism of benzoate and phthalate in Rhodococcus sp. strain RHA1: redundancies and convergence // Journal of Bacteriology. 2005. Vol. 187, No. 12. P. 4050–4063.

6. Tiso T. et al. Towards bio-upcycling of polyethylene terephthalate // Metabolic Engineering. 2021. Vol. 66. P. 167–178.

7. Werner A. Z. et al. Tandem chemical deconstruction and biological upcycling of poly(ethylene terephthalate) to β-ketoadipic acid by Pseudomonas putida KT2440 // Metabolic Engineering. 2021. Vol. 67. P. 250–261.

8. Diao J. et al. Upcycling of poly(ethylene terephthalate) to produce high-value bio-products // Cell Reports. 2023. Vol. 42, No. 1.

9. Kim H. T. et al. Biological valorization of poly(ethylene terephthalate) monomers for upcycling waste PET // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2019. Vol. 7, No. 24. P. 19396–19406.

10. Li Y. et al. Metabolic engineering of Escherichia coli for upcycling of polyethylene terephthalate waste to vanillin // Science of The Total Environment. 2024. Vol. 957. P. 177544.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-93

ПОЛУЧЕНИЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА ИЗ ЧЛЕНИСТОНОГИХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ ПИЩЕВОЙ УПАКОВКИ *

EXTRACTING CHITIN AND CHITOSAN FROM ARTHROPODS TO DEVELOP BIODEGRADABLE FOOD PACKAGING MATERIALS

Д. В. Крайнова, В. В. Баринова, О. В. Фрейнкман, Я. А. Ионов, Е. А. Назарова

Центр молекулярных и биологических технологий, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

D. V. Krainova, V. V. Barinova, O. V. Freinkman, Y. A. Ionov, E. A. Nazarova

Center for Molecular and Biological Technologies, ITMO University, Saint Petersburg

✉ dshkrjnv@gmail.com

Аннотация

В работе представлен метод экстракции хитозана из экзоскелетов личинок *Hermetia illucens* и хитина из антенн креветок *Litopenaeus vannamei* для получения биоразлагаемых материалов пищевой упаковки. Различия в методиках обработки обусловлены особенностями исходного сырья. Выход конечного продукта составил 9,0 % для хитозана и 3,6 % для хитина. Структурная идентичность биополимеров была подтверждена при помощи инфракрасной (ИК) спектроскопии.

Abstract

This study describes a method for extracting chitosan from *Hermetia illucens* larval exoskeletons and chitin from *Litopenaeus vannamei* shrimp antennae to develop biodegradable food packaging materials. Distinct processing approaches were necessitated by the unique properties of each feedstock. The obtained yields were 9.0 % for chitosan and 3.6 % for chitin. The structural integrity of both biopolymers was confirmed by infrared spectroscopy.

На сегодняшний день одним из приоритетных вопросов промышленности является получение экологичных и биосовместимых полимерных материалов. Одними из наиболее распространенных полимеров, имеющих потенциал широкого использования в пищевой и медицинской областях, являются азотсодержащий полисахарид хитин и его производное хитозан [1]. Эти биополимеры можно получить из природного сырья, включая побочные продукты его переработки, что будет способствовать наиболее эффективному и экологичному использованию вторичных ресурсов [2]. В условиях растущего спроса на экологичные материалы в пищевой, медицинской, упаковочной и иных отраслях промышленности разработка и оптимизация технологий получения биополимеров является актуальной и востребованной задачей.

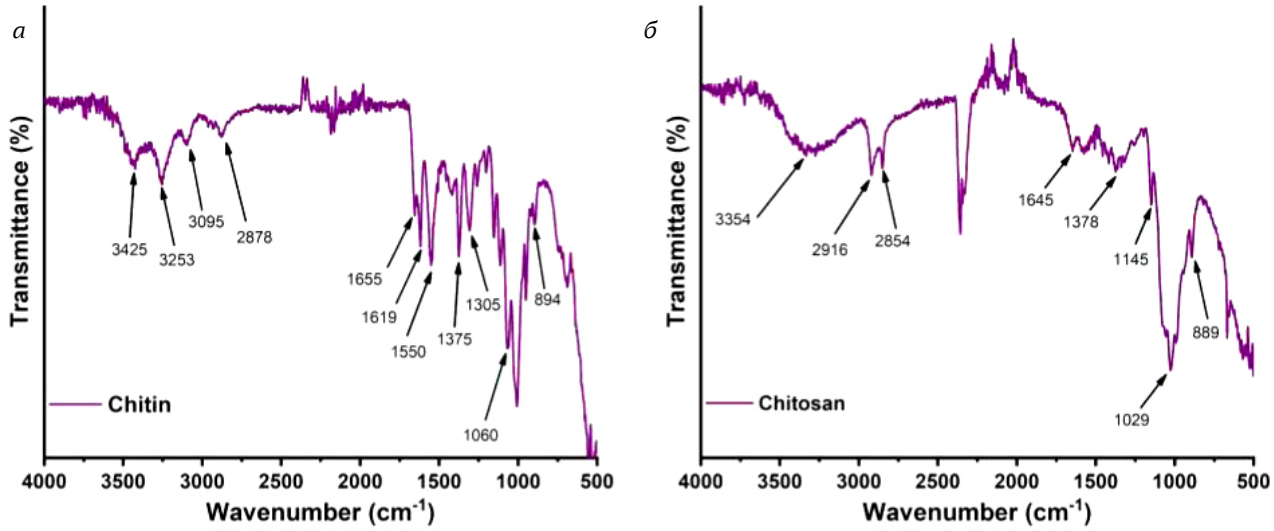
В данном исследовании были проведены работы по получению биополимеров из хитинсодержащих морфологических структур членистоногих, а именно — хитозан из экзоскелетов личинок черной львинки *Hermetia illucens*, а также хитин из антенн креветок *Litopenaeus vannamei*. Процесс экстракции хитина, а затем получения из него хитозана был проведен отдельно для каждого биологического источника сырья, и потому различался на некоторых этапах синтеза. Общими этапами при синтезе биополимеров из членистоногих являются последовательная температурная обработка щелочью для депротеинизации сырья, а также дальнейший гидролиз в соляной кислоте при кипячении с обратным холодильником. Методика получения хитозана из *Hermetia illucens* включает в себя дополнительные этапы по предварительному измельчению исходного сырья, а также его обесцвечивание на одном из промежуточных шагов при помощи перекиси водорода. В методике получения полимера из антенн *Litopenaeus vannamei* размером 1–2 см дополнительным этапом также является первичная деминерализация сырья. Кроме того, процессы синтеза различаются температурами их проведения, а также размером частиц конечных продуктов — для креветок осуществлялась дополнительная обработка ультразвуком с помощью ультразвуковой пушки для получения нанохитина со средним размером частиц 114 ± 44 нм.

Конечный выход целевых продуктов сильно различался в зависимости от источника сырья: выход хитозана из экзоскелетов личинок черной львинки *Hermetia illucens* составил 9,0 %, в то время как экспериментальный выход нанохитина в сухом виде из антенн креветок *Litopenaeus vannamei* получился около 3,6 %, где большая часть потерь пришлась на первый этап — этап деминерализации в соляной кислоте, отсутствовавший в методике для черной львинки. Экстрагированные биополимеры были охарактеризованы с помощью ИК-спектроскопии.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-76-10093).

© Д. В. Крайнова, В. В. Баринова, О. В. Фрейнкман, Я. А. Ионов, Е. А. Назарова, 2025

В ИК-спектрах хитина и хитозана наблюдаются характерные различия, обусловленные процессом деацетилирования. Для хитина (см. рисунок, *а*) характерны пики при 3425 $см^{-1}$ (группы O-H и N-H), 1655 $см^{-1}$ (амид I) и 1550 $см^{-1}$ (амид II, N-H). В ИК-спектре хитозана (см. рисунок, *б*) наблюдаются характерные пики при 3354 $см^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям N–H и O–H, а также при 1645 $см^{-1}$ (амид I).



ИК-спектры полученных биополимеров: *а* — хитин из антенн креветок *Litopenaeus vannamei*; *б* — хитозан из экзоскелетов личинок *Hermetia illucens*

Также были определены возможности дальнейшего применения хитина и хитозана как компонентов упаковки для пищевой промышленности благодаря биосовместимости и биодеградации материалов.

Литература

1. Yadav R. B. Biodegradable Packaging: Recent Advances and Applications in Food Industry // Food Process Engineering and Technology. Singapore: Springer, 2023. P. 189–213.

2. Moustafa H., Youssef A. M., Darwish N. A., Abou-Kandil A. I. Eco-friendly polymer composites for green packaging: Future vision and challenges // Composites Part B: Engineering. 2019. Vol. 172. P. 16–25.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-94

ЛЕКАРСТВЕННОЕ ПОКРЫТИЕ АОРТАЛЬНЫХ СТЕНТ-ГРАФТОВ

DRUG-ELUTING AORTIC STENT GRAFTS

А. Д. Кручинина, П. А. Попова

Пензенский государственный университет

A. D. Kruchinina, P. A. Popova

Penza State University

✉ a.d.kruchinina@mail.ru

Аннотация

Лекарственное покрытие аортальных стент-графтов выполнено на основе гидролизата коллагена, стабилизированного глутаровым альдегидом, и содержит ванкомицин в качестве антибактериального препарата. Предназначено для снижения рисков формирования послеоперационных осложнений и инфицирования протеза. В исследовании представлены результаты исследований *in vitro* на культурах микроорганизмов и мезенхимальных стромальных стволовых клеток.

Abstract

The drug coating of aortic stent grafts is based on collagen hydrolysate stabilized by glutaraldehyde and contains vancomycin as an antibacterial drug. It is intended to reduce the risk of postoperative complications and prosthesis infection. The study presents the results of in vitro studies on microorganism cultures and mesenchymal stromal stem cells.

Имплантируемые медицинские изделия — стент-графты, сердечно-сосудистые протезы, катетеры и другие устройства — являются неотъемлемой составляющей современной медицины, позволяющей улучшить терапевтические результаты лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы [1]. Для изготовления таких изделий используются различные биоматериалы синтетического и природного происхождения, которые взаимодействуют с биологическими системами для лечения и восстановления дефектных тканей, тем самым позволяют обеспечить правильное функционирование организма. Выбор биоматериала для разработки имплантируемого изделия должен основываться на различных факторах, среди которых можно выделить следующие: скорость коррозии/деградации; биосовместимость; токсичность; доступность; механические свойства [2]. Биосовместимые и биостабильные полимеры широко используются в качестве покрытий имплантируемых изделий, при этом основными критериями служат газопроницаемость и водопроницаемость покрытия для защиты изделия от влаги и ионов внутри организма человека, они должны обладать значительной прочностью на разрыв и медленной скоростью биодеградации в течение предполагаемого срока службы [3]. Обычно покрытие представляет собой тонкий слой вещества, нанесенный на поверхность изделия с целью улучшения свойств поверхности или обеспечения защиты изделия от внешних факторов. К тому же покрытия могут придавать медицинским изделиям множество дополнительных функций, например доставка лекарств. При разработке покрытия на основе полимеров важно учитывать предполагаемое медицинское применение, физико-химические свойства полимера и подложку, на которую будет наноситься покрытие [4].

Стент-графты представляют собой трубки, изготовленные из металлического каркаса и биосовместимого полимерного пористого материала. Коллагенсодержащее покрытие, стабилизированное глутаровым альдегидом, способно выдерживать высокие напряжения потока крови без протечки, а также обеспечивает доставку лекарственных средств в зону имплантации. Добавление ванкомицина в состав покрытия обеспечивает локальное высвобождение антибактериального препарата широкого спектра действия для снижения риска формирования биопленки на поверхности и инфицирования протеза за счет предотвращения адгезии и роста микроорганизмов на поверхности [5]. Целью исследования является изучение свойств покрытия в тестах *in vitro* на культурах микроорганизмов и мезенхимальных стромальных стволовых клеток.

Наличие антимикробной активности, обеспечивающей подавление жизнедеятельности микроорганизмов и их гибель, оценивали диско-диффузионным методом по диаметру зоны подавления роста микроорганизмов *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae*. Применение глутарового альдегида в качестве сшивающего агента позволяет стабилизировать покрытие, но сопряжено с по-

© А. Д. Кручинина, П. А. Попова, 2025

явлением цитотоксического действия, что требует исследования контактного и бесконтактного цитотоксического действия через 24 и 96 ч культивирования мезенхимальных стромальных стволовых клеток.

Результаты исследования антимикробной активности лекарственного покрытия представлены в таблице.

Результаты диско-диффузионного метода

Культура микроорганизмов	Диаметр зоны подавления роста, мм	Наличие антибактериального эффекта
Staphylococcus aureus	28	Есть
Enterococcus faecalis	25	Есть
Staphylococcus epidermidis	19	Есть
Streptococcus pneumoniae	22	Есть

Установлено наличие антимикробной активности лекарственного покрытия аортальных стент-графтов по отношению к *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae*.

При культивировании клеток на поверхности образцов количество живых клеток через 24 ч составило 87 ± 5 %, через 96 ч — 84 ± 6 %. При культивировании клеток в экстрактах, полученных из экспериментальных материалов, количество живых клеток через 24 ч составило 92 ± 6 %, через 96 ч — 87 ± 5 %. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии как контактного, так и бесконтактного цитотоксического действия лекарственного покрытия.

Литература

1. Кривкина Е. О., Матвеева В. Г., Антонова Л. В. Сосудистые протезы с противомикробным покрытием: экспериментальные разработки и внедрение в клиническую практику // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021. Т. 10, № 3. С. 90–102.

2. Helmus M. N., Gibbons D. F., Cebon D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices // Toxicologic pathology. 2008. Vol. 36, No. 1. P. 70–80.

3. Teo A. J. T. et al. Polymeric biomaterials for medical implants and devices // ACS Biomaterials Science & Engineering. 2016. Vol. 2, No. 4. P. 454–472.

4. Negut I., Bita B., Groza A. Polymeric Coatings and Antimicrobial Peptides as Efficient Systems for Treating Implantable Medical Devices Associated Infections // Polymers. 2022. Vol. 14, No. 8. P. 1611.

5. Von Eiff C. et al. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis // Drugs. 2005. Vol. 65. P. 179–214.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-95

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ИММУНОДЕФИЦИТНЫМ МЫШАМ

XENOTRANSPLANTATION OF HUMAN HEMATOPOIETIC STEM CELLS INTO IMMUNODEFICIENT MICE

Д. С. Кульчановская[1], Ю. С. Алексеева[1], А. А. Шувалова[1], И. Н. Гапоненко[2], В. О. Лаушкина[2], Д. Ю. Ивкин[1], А. И. Шакирова[2], К. В. Лепик[2], А. Р. Муслимов[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет
[2]НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

D. S. Kulchanovskaya[1], Yu. S. Alekseeva[1], A. A. Shuvalova[1], I. N. Gaponenko[2], V. O. Laushkina[2], D. Yu. Ivkin[1], A. I. Shakirova[2], K. V. Lepik[2], A. R. Muslimov[1]

[1]Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
[2]R. M. Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

✉ albert.muslimov@pharminnotech.com

Аннотация

Проведена апробация ксенотрансплантации CD34+ гемопоэтических стволовых клеток человека иммунодефицитным мышам. Показана высокая эффективность приживления донорского материала без сопутствующих осложнений. Представленная модель может быть перспективна для доклинических исследований генной и клеточной терапии.

Abstract

Xenotransplantation of CD34+ human hematopoietic stem cells into immunodeficient mice was tested. High engraftment efficiency of donor cells was demonstrated without associated complications. This model appears promising for preclinical studies in gene and cell therapy.

Введение

Генная и клеточная терапия является одной из наиболее быстро развивающихся и перспективных областей медицины, однако ключевой проблемой при внедрении инновационных терапевтических стратегий в клиническую практику остается обеспечение безопасности и эффективности разрабатываемых продуктов. Решение данной задачи требует проведения доклинических исследований на животных моделях, направленных на оценку терапевтической эффективности и потенциальных рисков.

Разрабатываемая гуманизированная модель на основе линии мышей с генетическим фоном *NOD/Scid* потенциально может стать универсальной базовой платформой, на которой впоследствии можно будет создавать новые модели патологических процессов: гематологические и солидные онкологические заболевания, реакция «трансплантат против хозяина», ряд аутоиммунных патологий. Используемая линия мышей представляется перспективной для ксенотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток человека, демонстрируя высокую эффективность приживления трансплантата без необходимости предварительного кондиционирования. Эти животные отличаются глубоким иммунодефицитом, который характеризуется отсутствием зрелых лимфоцитов, что сопровождается значительным снижением активности системы комплемента и выраженным ослаблением макрофагального фагоцитоза в отношении ксеногенных (человеческих) клеток. **Целью** работы является оценка эффективности приживления человеческих гемопоэтических стволовых клеток после трансплантации иммунодефицитным мышам в контексте разработки базовой гуманизированной животной модели *in vivo*.

Материалы и методы

В исследовании были использованы иммунодефицитные мыши, несущие мутации в генах *Prkdc* (тяжелый комбинированный иммунодефицит), *Il2rg* (отсутствие зрелых Т-, В- и NK-клеток). Для создания ксенографтной модели гемопоэза человека использовались образцы отобранных методом магнитной сепарации CD34+ гемопоэ-

© Д. С. Кульчановская, Ю. С. Алексеева, А. А. Шувалова, И. Н. Гапоненко, В. О. Лаушкина, Д. Ю. Ивкин, А. И. Шакирова, К. В. Лепик, А. Р. Муслимов, 2025

тических стволовых клеток человека периферической крови здорового донора. Животным из экспериментальной группы (n = 4) были внутривенно введены CD34+ клетки в дозе 2 × 10^6, с чистотой популяции 77 %. Контрольная группа животных (n = 1) получила эквивалентный объем физиологического раствора внутривенно. Клинический осмотр и взвешивание животных проводились еженедельно, с целью оценки общего состояния животных и выявления специфических посттрансплантационных осложений. Оценка эффективности приживления была проведена методом проточной цитофлуориметрии образцов костного мозга, селезенки и периферической крови животных, полученных после завершения эксперимента (неделя 20 после проведения ксенотрансплантации). Все процедуры были выполнены в строгом соответствии с международными и локальными этическими стандартами работы с лабораторными животными.

Результаты и обсуждение

По результатам еженедельных клинических осмотров животных после проведения процедуры ксенотрансплантации признаков неблагополучия по оцениваемым параметрам зарегистрировано не было. Была зафиксирована еженедельная прибавка в массе тела в пределах видовой нормы, признаки реакции «трансплантат против хозяина» отсутствовали. Данные, полученные в результате проведения проточной цитофлуориметрии, показали, что доля клеток hCD45+ в костном мозге животных экспериментальной группы составляет 90,49 ± 2,88 %, в селезенке 64,81 ± 2,35 %, в периферической крови 19,09 ± 7,27 %, что демонстрирует смешанный донорский химеризм. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности и высокой эффективности трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в выбранной экспериментальной модели.

Выводы

Разработанная модель гуманизации, основанная на ксенотрансплантации CD34+ гемопоэтических стволовых клеток человека иммунодефицитным мышам, может стать базовой платформой для дальнейших исследований в контексте доклинической разработки продуктов генной и клеточной терапии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-96

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СТРЕССА КАК ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИКАЦИИ ИМПЛИЦИТНЫХ КОГНИТИВНЫХ УСТАНОВОК

EPIGENETIC STRESS MARKERS AS PREDICTORS OF IMPLICIT COGNITIVE-BIAS MODIFICATION

И. М. Курганский

Федеральный комитет по контролю, борьбе с экстремизмом, коррупцией и терроризмом, Москва

I. M. Kurganskiy

Federal Committee for Control, Combating Extremism, Corruption and Terrorism, Moscow

✉ mcv.bear@gmail.com

Аннотация

Исследуется, могут ли эпигенетические маркеры стресса прогнозировать эффективность модификации имплицитных когнитивных установок при нейростимуляции и когнитивной терапии. Предварительные данные указывают на потенциальную роль таких маркеров в индивидуальных различиях отклика на интервенции, однако малые выборки и противоречивость результатов пока ограничивают их практическое применение.

Abstract

The study examines whether epigenetic stress markers can predict the effectiveness of modifying implicit cognitive attitudes through neurostimulation and cognitive therapy. Preliminary evidence suggests a potential predictive role of such markers in individual differences in intervention response; however, small sample sizes and inconsistent findings currently limit their practical utility.

Имплицитные когнитивные установки — неосознаваемые оценки и ассоциации — существенно влияют на поведение и психическое состояние, включая реакцию на стресс. Интервенции для модификации этих установок (методы когнитивной терапии и нейростимуляции) позволяют ослабить деструктивные шаблоны мышления и улучшить адаптацию [1]. Однако эффективность подобных подходов значительно варьирует между людьми. Это стимулирует поиск биологических предикторов успешности вмешательств для разработки персонализированных стратегий. Эпигенетические маркеры стресса рассматриваются как перспективные кандидаты на такую роль.

Эпигенетические маркеры — это измененные под влиянием опыта (включая стресс) химические метки на ДНК или белках хроматина, способные влиять на активность генов без изменения нуклеотидной последовательности. Они отражают долговременные сдвиги в системах, отвечающих за реакцию на стресс и когнитивную адаптивность. В контексте модификации когнитивных установок наибольший интерес представляют эпигенетические состояния генов, связанных со стресс-реактивностью и когнитивной гибкостью. В частности, *FKBP5* участвует в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (HPA) оси, а *COMT* определяет уровень дофамина в префронтальной коре, влияя на когнитивный контроль [2]. Таким образом, эпигенетический профиль по этим и сходным генам может влиять на способность мозга перестраивать дисфункциональные имплицитные ассоциации.

В сфере нейростимуляции (транскраниальной магнитной или электрической стимуляции мозга) влияние эпигенетических факторов на эффективность вмешательства прослеживается особенно отчетливо. Нейростимуляция повышает нейропластичность, облегчая формирование новых когнитивных паттернов, и ее результативность может частично зависеть от эпигенетических особенностей индивида. Например, различия в активности гена *COMT* связаны с разной степенью когнитивного улучшения при стимулировании префронтальной коры [3]. Кроме того, одновременная нейростимуляция способна изменять эпигенетическое состояние: при экспериментальном стрессе транскраниальная стимуляция модифицировала динамику метилирования гена *COMT* [4], что подтверждает двустороннюю связь между нейромодуляцией и эпигеном.

Эффективность психологических вмешательств, таких как когнитивно-поведенческая терапия, также может зависеть от эпигенетических особенностей пациента, определяющих пластичность его устоявшихся автоматических установок. Особый интерес представляет ген *FKBP5*: уровень его метилирования влияет на регуляцию гормонов стресса, эмоциональную память и реактивность. Предварительные исследования показывают, что у пациентов, успешно прошедших коррекцию негативных автоматических установок, наблюдается повы-

© И. М. Курганский, 2025

шение метилирования *FKBP5*, тогда как у неответчиков подобных изменений не выявляется [5]. Это позволяет предположить, что эпигенетический статус *FKBP5* способен предсказывать успех модификации имплицитных установок.

Несмотря на обнадеживающие результаты отдельных работ, направление изучения эпигенетических предикторов эффективности интервенций находится на ранней стадии и сталкивается с серьезными ограничениями. Большинство исследований основано на малочисленных выборках и гетерогенных группах, что затрудняет воспроизводимость данных. Методологические различия (в выборе маркеров, типах вмешательств, критериях оценки) также способствуют противоречивости результатов. Пока эпигенетические маркеры стресса (*FKBP5, COMT* и др.) следует рассматривать скорее как перспективные объекты исследования, чем как надежные инструменты прогноза. Необходимы масштабные продольные исследования, чтобы подтвердить прогностическую значимость этих маркеров и раскрыть механизмы их влияния на эффективность нейростимуляции и когнитивной терапии.

Литература

1. Dehghani A., Soltanian-Zadeh H., Hossein-Zadeh G.A. Neural modulation enhancement using connectivity-based EEG neurofeedback with simultaneous fMRI for emotion regulation // NeuroImage. 2023. Vol. 279. P. 120320.

2. Виганд А., Бликле А., Брюкманн К. и др. Динамические изменения метилирования ДНК в области промотора гена COMT в ответ на психический стресс и их модуляция транскраниальной стимуляцией постоянным током // Биомолекулы. 2021. Т. 11, № 11. С. 1726.

3. Hayek D., Antonenko D., Witte A.V. et al. Impact of COMT val158met on tDCS-induced cognitive enhancement in older adults // Behavioural Brain Research. 2021. Vol. 401. Art. 113081.

4. Vidovič E., Pelikan S., Atanasova M. et al. DNA methylation patterns in relation to acute severity and duration of anxiety and depression // Current Issues in Molecular Biology. 2023. Vol. 45, No. 9. P. 7286–7303.

5. Bishop J.R., Lee A.M., Mills L.J. et al. Methylation of FKBP5 and SLC6A4 in relation to treatment response to mindfulness-based stress reduction for posttraumatic stress disorder // Frontiers in Psychiatry. 2018. Vol. 9. Art. 418.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-97

ФОРМИРОВАНИЕ ПОРИСТЫХ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕМПЛАТОВ *

FORMATION OF POROUS ORGANOSILICON MATERIALS USING BIOTEMPLATES

Е. А. Ланцова, Д. А. Колыхалов

Тульский государственный университет

E. A. Lantsova, D. A. Kolykhalov

Tula State University

✉ e.a.lantsova.tsu@gmail.com

Аннотация

В работе сформированы 2 типа материалов на основе аминопропилтриэтоксисилана и тетраэтоксисилана в объемном соотношении 5 : 95 % — с использованием дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 и дальнейшим их удалением N-метилпирролидоном и без использования клеток дрожжей. С помощью УФ-спектроскопии установлено, что биотемплаты позволяют улучшить загрузку и десорбцию октенидина.

Abstract

In the work, 2 types of materials based on aminopropyltriethoxysilane and tetraethoxysilane in a volume ratio of 5 : 95 % were formed: using *Ogataea polymorpha* VKM Y-2559 yeast and their subsequent removal with N-methylpyrrolidone and without the use of yeast cells.

Постоянное развитие резистентности микроорганизмов к антибиотикам и антисептикам требует развития новых методов борьбы [1]. Одними из эффективных средств могут стать антибактериальные материалы с различными механизмами действия, например с высвобождением четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) [2]. Октенидин дигидрохлорид относится к ЧАС с двумя положительное заряженными четвертичными атомами азота, обладает широкой антибактериальной активностью и безопасен для человека. Одним из методов формирования загрузочного материала является технология золь-гель [3]. Для получения пор внутри материала вместо традиционных шаблонов — мицелл поверхностно-активных веществ — возможно использование биотемплатов. Клетки микроорганизмов характеризуются экологичностью и экономичностью при получении их биомассы, схожестью форм и размеров среди клеток одного штамма. Достаточно большой размер клеток позволит сформировать крупные поры для сорбции антисептического вещества и его дальнейшего высвобождения без диффузионных затруднений.

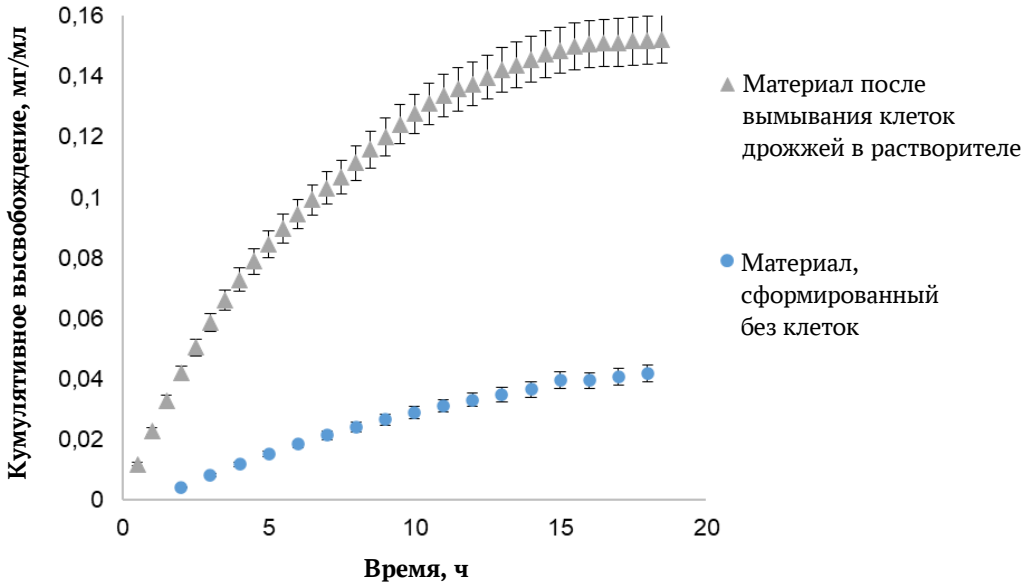
В исследовании были сформированы материалы I типа с использованием клеток дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 и силановых предшественников аминопропилтриэтоксисилана и тетраэтоксисилана в объемном соотношении 5 : 95 об.%. Для удаления клеток применялся растворитель N-метилпирролидон, осуществлялся нагрев при 165 °С в течение 2 ч. Полученный материал промывали дистиллированной водой и ацетоном. Кроме того, для сравнения был синтезирован материал II типа без использования клеток с таким же соотношением силановых предшественников. Затем в высушенные образцы был загружен октенидин с концентрацией 20 мг/мл, после чего были изучены сорбционные и десорбционные свойства материалов методом УФ-спектроскопии.

При постоянном разбавлении исследуемой пробы с материалом I типа, из которого высвобождается октенидин (ОКТ), установлено, что высвобождение активного вещества проходит в две стадии (см. рисунок). Первая стадия длится около 5 ч, происходит активное высвобождение антисептического вещества с поверхности материала. Затем наступает фаза пролонгированного высвобождения, в течение 15 ч происходит высвобождение ОКТ из внутренних пор матрицы. Для материала II типа характерна практически линейная зависимость высвобождения вещества.

Материал I типа, сформированный с использованием клеток дрожжей, удаленных N-метилпирролидоном, обладает лучшими свойствами, поскольку характеризуется сорбцией 78,9 мкг/мл и высвобождением 30,4 мкг/мл октенидина из 1 мг образца. В то же время материал II типа сорбирует 25,3 мкг/мл и десорбирует 8,4 мкг/мл октенидина из 1 мг образца.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-23-00410).

© Е. А. Ланцова, Д. А. Колыхалов, 2025



Зависимость высвобождения октенидина из матриц I и II типа от времени

Таким образом, применение клеток дрожжей в процессе формировании золь-гель-матрицы и при дальнейшем удалении растворителем позволяет получить материал с большей сорбционной емкостью по сравнению с материалом, синтезированным без использования клеток. Дальнейшие изучения материала будут связаны с возможностью сшивки с триазольными фрагментами, обладающими фунгицидными свойствами, для получения биоцидного материала с возможностью действия против бактерий и грибков.

Литература

1. Huang L., Liu C.-J. Progress for the development of antibacterial surface based on surface modification technology // Supramol. Mater. 2022. Vol. 1. P. 100008.

2. Noureddine A. et al. Future of Mesoporous Silica Nanoparticles in Nanomedicine: Protocol for Reproducible Synthesis, Characterization, Lipid Coating, and Loading of Therapeutics (Chemotherapeutic, Proteins, siRNA and mRNA) // ACS Nano. American Chemical Society. 2023. Vol. 17, No. 17. P. 16308–16325.

3. Şen Karaman D. et al. Core@shell structured ceria@mesoporous silica nanoantibiotics restrain bacterial growth in vitro and in vivo // Biomater. Adv. 2022. Vol. 133. P. 112607.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-98

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *B. SUBTILIS* IV3 С ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ГЕНОМ БАЦИЛЛИБАКТИНА (*DHBF*) *

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF *B. SUBTILIS* IV3 STRAIN WITH DELETED BACILLIBACTIN GENE (*DHBF*)

Е. Э. Ласточкина, Е. С. Волкова, Ю. А. Васильева, Н. Л. Рудакова, М. Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

E. E. Lastochkina, E. S. Volkova, I. A. Vasileva, N. L. Rudakova, M. R. Sharipova

Kazan Federal University

✉ lelya_lastochkina@bk.ru

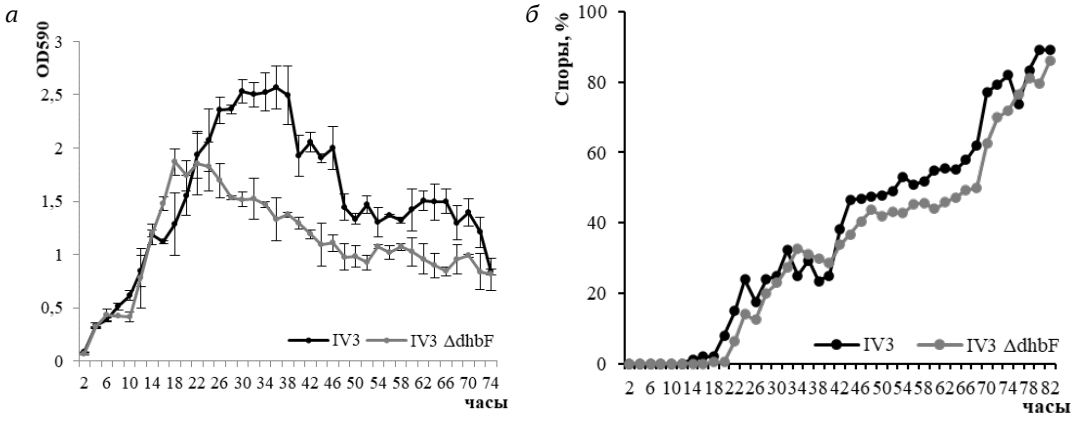
Аннотация

B. subtilis IV3 является ризосферным изолятом с фитопротекторными свойствами. Методом CRISPR/Cas9 редактирования генома получен мутант *B. subtilis* IV3Δ*dhbF* с удаленным геном сидерофора бациллибактина (DhbF). Сравнительное исследование динамики роста и спорообразования двух штаммов показало, что утрата бациллибактина приводит к снижению интенсивности роста штамма, но не влияет на спорообразование.

Abstract

B. subtilis IV3 is a rhizosphere isolate with phytoprotective properties. The CRISPR/Cas9 genome editing method was used to obtain the *B. subtilis* IV3Δ*dhbF* mutant with a deleted bacillibactin siderophore gene (DhbF). A comparative study of the growth dynamics and sporulation of the two strains showed that the loss of bacillibactin leads to a decrease in the growth intensity of the strain, but does not affect sporulation.

Бактерии рода *Bacillus* широко известны как эффективные фитопротекторные и стимулирующие рост растений агенты. Они играют ключевую роль в агроэкосистемах, повышая продуктивность растений и их устойчивость к стрессовым условиям. К числу важнейших механизмов их биологической активности относятся антагонизм к фитопатогенам, способность к колонизации корней, напрямую связанная с формированием биопленок, продукция фитогормонов (ИУК), а также синтез сидерофоров (железохелатирующих соединений). Бациллибактин является основным сидерофором у *B. subtilis* и играет ключевую роль в конкурентной борьбе за железо в ризосфере. Также бациллибактин обладает антибиотической активностью против ряда фитопатогенных бактерий и грибов.



Сравнительная характеристика дикого (IV3) и мутантного с делецией гена бациллибактина (IV3ΔdhbF) штаммов *B. subtilis* IV3: *а* — динамика роста культуры, *б* — накопление свободных спор

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-16-00143).

© Е. Э. Ласточкина, Е. С. Волкова, Ю. А. Васильева, Н. Л. Рудакова, М. Р. Шарипова, 2025

Целью работы было оценить комплексный вклад бациллибактина в способность штамма *B. subtilis* IV3 стимулировать рост растений.

Геном природного изолята *B. subtilis* IV3 был полностью секвенирован и внесен в базу данных NCBI под номером ASM3859428v1. Методом CRISPR/Cas9 редактирования генома был получен мутант *B. subtilis* IV3Δ*dhbF* с удаленным ключевым геном биосинтеза бациллибактина *dhbF*. Для обоих штаммов была исследована динамика роста и спорообразования на жидкой среде LB при 37 °C с аэрацией в течении 80 ч. Пробы отбирались через каждые 2 ч. Рост культуры контролировали по изменению оптической плотности (OD590). Количество свободных спор оценивали микрокопированием с окрашиванием по методу Шефера — Фултона.

Сравнение динамики роста исследуемых штаммов показало статистически значимое снижение роста мутантного штамма (более 30 %) по сравнению с диким типом (см. рисунок).

До 20-го часа кривые роста обоих штаммов не различаются, далее мутантный штамм переходит к стационарной фазе, а дикий тип продолжает набор биомассы с замедлением роста после 30-го часа (см. рисунок, *а*). При этом к 72-му часу роста снижение оптической плотности культуры относительно собственного максимума для дикого типа составляет 43 %, в то время как для мутанта 31 %. Таким образом, с потерей гена бациллибактина штамм медленнее набирает биомассу, быстрее выходит на стационар и медленнее отмирает. При этом удаление гена *dhbF* не оказало значимого влияния на спорообразование (см. рисунок, б). Возможно, ген бациллибактина вовлечен в адаптационные механизмы штамма, но не является критически значимым для смены стратегии при переходе к спорообразованию.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-99

СКРИНИНГ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

DESIGN OF A PANEL OF BACTERIOLYTIC PROTEINS FOR DEVELOPING NOVEL ANTIBACTERIAL MEDICATIONS

А. М. Лендел, Н. П. Антонова, И. В. Григорьев, А. В. Дедова, Е. В. Усачев, Д. В. Васина

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

A. M. Lendel, N. P. Antonova, I. V. Grigoriev, A. V. Dedova, E. V. Usachev, D. V. Vasina

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ kazejosei@gmail.com

Аннотация

Получена панель из рекомбинантных фаговых лизинов, активных в отношении полирезистентных бактерий родов *Acinetobacter, Pseudomonas* и семейства Enterobacteriaceae. Показана их способность разрушать биопленки. Лизины характеризуются различными оптимумами pH и низкой токсичностью в отношении клеток эукариот. Таким образом, данная коллекция лизинов применима в разработке лекарственных средств.

Abstract

A panel of recombinant bacteriophages' lysins acting *versus* multidrug-resistant representatives of *Acinetobacter, Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae f. was designed. The investigated proteins are capable to disrupt biofilms of *A. baumannii, K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, possess different pH optima and are low in toxicity towards eukaryotic cells. Thus, this collection of lysins is applicable in drug development.

В последние десятилетия распространение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у клинически значимых бактерий стало глобальным вызовом для медицины. Эта проблема, в совокупности с новыми данными о вкладе биопленок в инфекционный патогенез, привела к появлению решений, предлагающих альтернативные антибиотикам методы борьбы с бактериальными инфекциями. Так, одним из перспективных направлений в терапии заболеваний, вызванных бактериями с МЛУ, является использование литических белков бактериофагов — лизинов. Природное разнообразие лизинов позволяет создавать универсальные платформы для формуляции новых антибактериальных препаратов. Целью данной работы стала характеристика новой панели рекомбинантных литических белков, направленных на борьбу с грамотрицательными бактериями.

На основании данных геномов бактериофагов, демонстрирующих выраженное литическое действие в отношении высокопатогенных грамотрицательных бактерий, были получены 11 последовательностей, кодирующих различные типы лизинов. После трансформации сконструированных на их основе экспрессионных векторов в штамм-продуцент *Escherichia coli,* продукции и хроматографической очистки выделены 7 белков (см. таблицу). Для полученных ферментов изучали *in vitro* антибактериальную активность, их биохимические свойства и цитотоксическое действие.

Полученные рекомбинантные лизины

Источник, фаг бактерии рода	Код	Каталитический домен	Прочие домены
Pseudomonas	GRC-EL03	Мурамидаза/хитиназа семейства GH19	–
Escherichia	GRC-EL05	Мурамидаза/трансгликозилаза GH104	–
Aeromonas	GRC-EL06	Мурамидаза GH24	–
Raoultella	GRC-EL07	SleB-подобная гидролаза	–
	GRC-EL08	Мурамидаза/хитиназа GH19	–
Proteus	GRC-EL10	–	Трансмембранный домен Rz-подобный спанин
Acinetobacter	GRC-EL14	Мурамидаза GH24	CWBD_1

© А. М. Лендел, Н. П. Антонова, И. В. Григорьев, А. В. Дедова, Е. В. Усачев, Д. В. Васина, 2025

Все исследуемые белки оказывали выраженное антибактериальное действие в гипотонических условиях (20 мМ Трис HCl pH = 7,5). Обработка чувствительных штаммов лизинами в концентрации 1–10 мкг/мл в течение 30 мин приводила к снижению бактериального титра ⩾ 0,5 lg по сравнению с контролем роста. При повышении концентрации лизинов до 100 мкг/мл, как правило, антибактериальный эффект белков значительно усиливался, достигая снижения до 3,2 lg. Наиболее широкий спектр действия демонстрировал GRC-EL14, приводивший к отсутствию роста большинства штаммов *A. baumannii, P. aeruginosa, E. coli* и *Salmonella enterica*. Широким спектром активности также обладали лизины GRC-EL05, GRC-EL06 и GRC-EL07, хотя их действие в отношении *S. enterica* было ограничено. Остальные белки действовали более специфично: GRC-EL08 практически не ингибировал рост *P. aeruginosa,* но показал высокую эффективность в отношении энтеробактерий (клебсиелл и эшерихий), в то время как для GRC-EL03 и GRC-EL10 прослеживалась межвидовая избирательность действия.

В концентрациях 10–100 мкг/мл исследуемые лизины приводили к дозозависимому снижению плотности зрелых биопленок *A. baumannii* и *K. pneumoniae* в 2–4 раза. С другой стороны, только GRC-EL10 и GRC-EL14 разрушали мукоидные биопленки, сформированные *P. aeruginosa*.

Антибактериальный эффект белков значительно подавлялся в фосфатно-солевом буфере pH = 7,4 (PBS). Однако для всех исследуемых лизинов, за исключением хитиназоподобных лизоцимов GRC-EL03 и GRC-EL08, можно отметить высокую стабильность как в бессолевом буферном растворе Трис HCl, так и в PBS. Мурамидазы GRC-EL06, GRC-EL08 и GRC-EL14 проявляли максимальное антибактериальное действие при pH = 5,0. Активность остальных белков была выше в нейтральной и щелочной среде. Инкубация лизинов в диапазоне температур 40–50 °C в течение часа приводила к ингибированию антибактериального действия, за исключением GRC-EL03, GRC-EL06 и GRC-EL14.

Значительное снижение жизнеспособности клеточной культуры почки эмбриона человека HEK293 или кератиноцитов HaCaT и нарушение целостности формируемого ими монослоя отмечено только при воздействии ⩾ 500 мкг/мл GRC-EL03 или GRC-EL14.

Полученные результаты подтверждают применимость разработанной панели литических белков в качестве основы для новых биотехнологических средств, показанных для терапии различных бактериальных инфекций, трудно поддающихся лечению антибиотиками.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-100

ПРИМЕНЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО КАТОДА ДЛЯ ВЫРАБОТКИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В РАСТИТЕЛЬНОМ МИКРОБНОМ ТОПЛИВНОМ ЭЛЕМЕНТЕ *

APPLICATION OF MODIFIED CATHODE FOR HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION IN THE PLANT MICROBIAL FUEL CELL

Р. В. Лепикаш, С. В. Алферов

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии Тульского государственного университета

R. V. Lepikash, S. V. Alferov

Laboratory of Environmental and Medical Biotechnology, Tula State University

✉ mr.romalep@yandex.ru

Аннотация

В данной работе для улучшения электрохимических характеристик и выработки H_2O_2 в двухкамерных растительных микробных топливных элементах в качестве катода использовали электрохимически окисленный углеродный войлок. Показано, что применение модифицированного катода в РМТЭ увеличивает мощность и снижает внутреннее сопротивление. В режиме замкнутой цепи выработка H_2O_2 увеличивается в 5 раз.

Abstract

In this work, electrochemically oxidized carbon felt was used as a cathode to improve the electrochemical characteristics and H_2O_2 production in dual-chamber plant microbial fuel cells. It was shown that the use of a modified cathode in PMFC increases the power and reduces the internal resistance. In the closed-curciut mode, the production of H_2O_2 increases 5 times.

Традиционные централизованные системы очистки сточных вод имеют высокую стоимость и не могут использоваться в отдаленных районах из-за экономической неэффективности [1]. В связи с этим возрастает интерес к децентрализованным системам очистки, которые позволяют локально обрабатывать сточные воды. Применение биоэлектрохимических систем, в частности растительных микробных топливных элементов [2], позволяет разработать децентрализованную автономную систему очистки сточных вод и снизить антропогенную нагрузку на окружающую среду. Полученная в результате окисления органических соединения электроэнергия может быть направлена на выработку H_2O_2 в катодном пространстве для электрофентоновских процессов [3].

Процессы электро-Фентона применяются для удаления токсичных органических соединений путем генерации H_2O_2 и его последующего взаимодействия с ионами Fe^{2+}, в результате чего происходит разложение перекиси водорода с образованием высокореакционных радикалов OH•, эффективно окисляющих органические соединения [4]. В настоящее время исследуются подходы к увеличению эффективности данных процессов за счет использования катализаторов реакции восстановления кислорода по двухэлектронному механизму до H_2O_2. В качестве перспективного катодного материала рассматривают модифицированные углеродные материалы, обладающие низкой стоимостью, развитой поверхностью и низкой токсичностью [3]. Для увеличения выработки перекиси в реакции электро-Фентона в данной работе был выбран электрохимический способ окисления углеродного войлока. Полученный электрод далее использовался в качестве катода в двухкамерном растительном микробном топливном элементе на основе бактерий *Pseudomonas chlororaphis* ВКВ В-2188D и растения *Lemna minor*.

Модификацию углеродного войлока проводили электрохимически в потенциостатическом режиме в 5%-м (0,38 М) электролите $(NH_4)_2HPO_4$ при различных потенциалах в двухэлектродной системе. В качестве рабочего электрода использовали углеродной войлок, в качестве электрода сравнения — графитовый стержень. После электрод промывали и высушивали при 195 °С. Оценку выработки H_2O_2 (рис. 1) проводили в потенциостатическом режиме в трехэлектродной ячейке при −0,5 В с непрерывной аэрацией. Электролит содержал 0,05 М Na_2SO_4, подкисленный до pH = 3. Количественный анализ H_2O_2 проводили спектрофотометрическим методом, основанным на окислении I^- до I_2 в кислой среде [5] с последующим образованием окрашенного комплекса KI_3 и измерении оптической плотности при λ = 350 нм [6].

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2024-0003 «Биокаталитические системы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами».

© Р. В. Лепикаш, С. В. Алферов, 2025

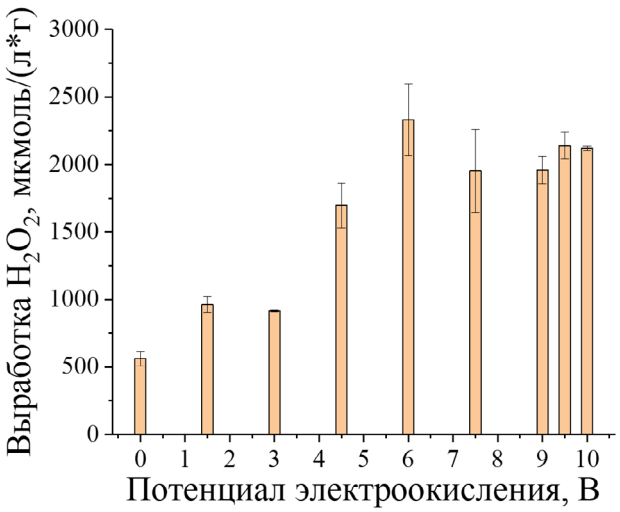


Рис. 1. Выработка H_2O_2 в потенциостатическом режиме

Электроокисленный войлок демонстрирует повышенную выработку перекиси в потенциостатическом режиме, что обусловлено увеличением площади поверхности и наличием кислородсодержащих групп, которые проявляют каталитическую активность в реакции восстановления кислорода по двухэлектронному пути до H_2O_2 [7]. Углеродный войлок, электроокисленный при напряжении 6 В, использовали в двухкамерной системе РМТЭ.

Для исследуемых систем РМТЭ измеряли потенциал разомкнутой цепи ($E_{ОСР}$, мВ) и силу тока короткого замыкания ($I_{кз}$, мА), по поляризационным кривым (рис. 2) определяли удельную мощность (P, мВт/м^2) и внутреннее сопротивление ($R_{внт}$, Ом). Выработку H_2O_2 оценивали через неделю функционирования двухкамерной системы РМТЭ в режиме замкнутой цепи при R = 100 Ом. Электрохимические параметры систем РМТЭ по сравнению с контролем представлены в таблице.

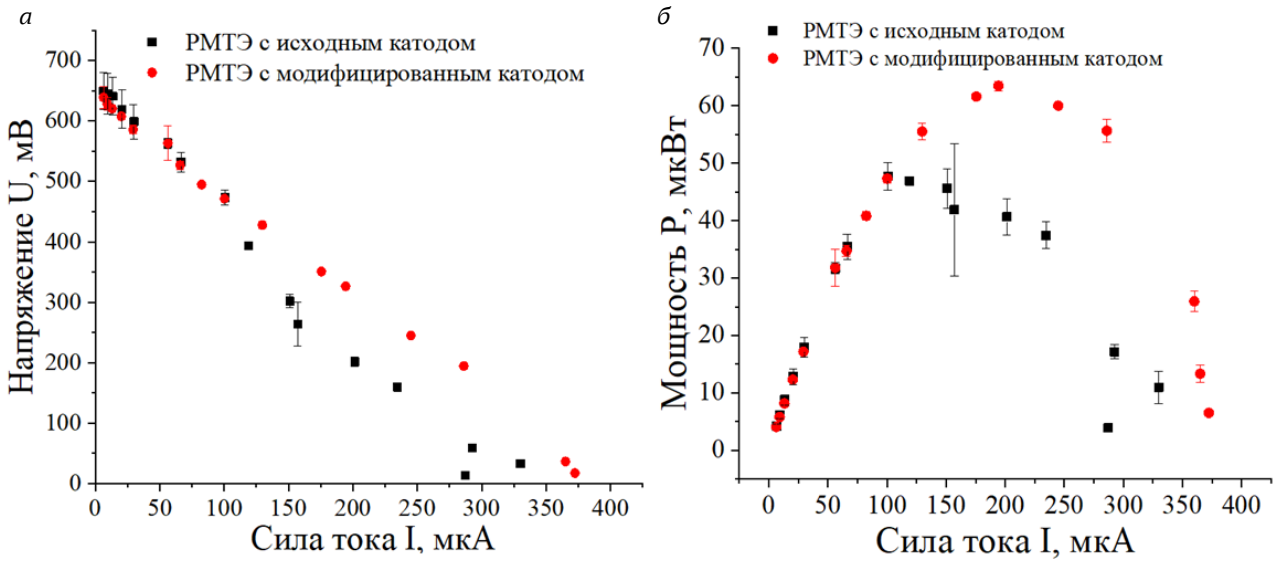


Рис. 2. Поляризационная кривая (*а*) и кривая мощности (*б*) для двухкамерных РМТЭ

Электрохимические характеристики двухкамерных систем РМТЭ

Характеристика	Вид катода	
	РМТЭ-УВ-контроль	РМТЭ-УВ-окисленный
Потенциал разомкнутой цепи, $E_{ОСР}$, мВ	650 ± 20	631 ± 7
Сила тока короткого замыкания $I_{кз}$, мкА	330 ± 30	410 ± 10
Мощность P, мкВт	48 ± 2	64 ± 1
Внутреннее сопротивление $R_{внт}$, кОм	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Выработка H_2O_2, мкмоль/л	2,1 ± 0,9	11 ± 2

Применение электрохимически окисленного углеродного войлока способствует снижению внутреннего сопротивления и увеличению мощности системы РМТЭ за счет образования кислородсодержащих групп, катализирующих реакцию восстановления кислорода до H_2O_2 [7]. При функционировании в режиме замкнутой цепи выработка перекиси увеличивается практически в 5 раз. Таким образом, полученный углеродный войлок может быть использован в качестве катода в системах био-электро-Фентона.

Литература

1. Sha C. et al. A Review of Strategies and Technologies for Sustainable Decentralized Wastewater Treatment // Water. MDPI AG, 2024. Vol. 16, No. 20. P. 3003.

2. Kataki S. et al. Constructed wetland, an eco-technology for wastewater treatment: A review on various aspects of microbial fuel cell integration, low temperature strategies and life cycle impact of the technology // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2021. Vol. 148. P. 111261.

3. Lv J. et al. A critical review of approaches to enhance the performance of bio-electro-Fenton and photo-bio-electro-Fenton systems // Journal of Environmental Management. 2024. Vol. 365. P. 121633.

4. Berhe R. N. et al. Performance evaluation of Fe3O4@ACF-supported bio-electro Fenton system for simultaneous sewage treatment and methyl orange degradation // Materials Today Communications. 2023. Vol. 35. P. 106331.

5. Sunil K., Narayana B. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide in Water and Cream Samples // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2008. Vol. 81, No. 4. P. 422–426.

6. Алукер Н. Л., Herrmann M. Спектрофотометрическое определение форм присутствия йода в растворах соединений йода // Оптика и спектроскопия. 2021. Т. 129, № 5. С. 659.

7. Miao J. et al. Graphite felt electrochemically modified in H2SO4 solution used as a cathode to produce H2O2 for pre-oxidation of drinking water // Chemical Engineering Journal. 2014. Vol. 250. P. 312–318.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-101

ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ENV-ТРИМЕРА ВИЧ-1 ПОДТИПА A6, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ*

OBTAINING A STABILIZED ENV TRIMER OF HIV-1 SUBTYPE A6 CIRCULATING IN THE RUSSIAN FEDERATION

К. П. Макарова, Н. Б. Рудометова, Л. И. Карпенко, А. П. Рудометов

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

K. P. Makarova, N. B. Rudometova, L. I. Karpenko, A. P. Rudometov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ makarova@yandex.ru

Аннотация

В настоящей работе был получен стабилизированный тример Env ВИЧ-1 gp140(A6).SOSIP.664, сконструированный на основе консенсусной последовательности подтипа A6, циркулирующего в Российской Федерации.

Abstract

In this work, a stabilized HIV-1 Env trimer gp140(A6).SOSIP.664 was obtained, constructed based on the consensus sequence of the A6 subtype circulating in the Russian Federation.

Одним из перспективных направлений в разработке вакцины против вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) является получение стабилизированных тримеров Env, воспроизводящих нативную конформацию вирусного белка. Тримеры Env способны вызывать выработку широко нейтрализующих антител, которые могут распознавать и нейтрализовать различные варианты ВИЧ-1.

На первом этапе работы осуществляли расчет гена, кодирующего стабилизированный тример Env ВИЧ-1 подтипа A6. В качестве основы при расчете был использован консенсусный вариант аминокислотной последовательности Env ВИЧ-1 подтипа A6, полученный комплексным выравниванием последовательностей, представленных в базе данных Лос-Аламосской национальной лаборатории на 28 октября 2024 года.

Полученная консенсусная аминокислотная последовательность была дополнительно оптимизирована: природный сигнальный пептид Env был заменен на N-концевую сигнальную последовательность люциферазы Gaussia (Gluc); были введены мутации SOSIP; также были удалены MPER-область, трансмембранный и цитоплазматический домены для лучшей экспрессии проектируемого белка; после аминокислотного остатка 664 на С-конце добавляли 6×His для последующей очистки. Полученный вариант тримера Env подтипа A6 обозначили как gp140(A6).SOSIP.664. Пространственное моделирование полученной последовательности проводили с использованием нейросети Alphafold 3 colab (см. рисунок).

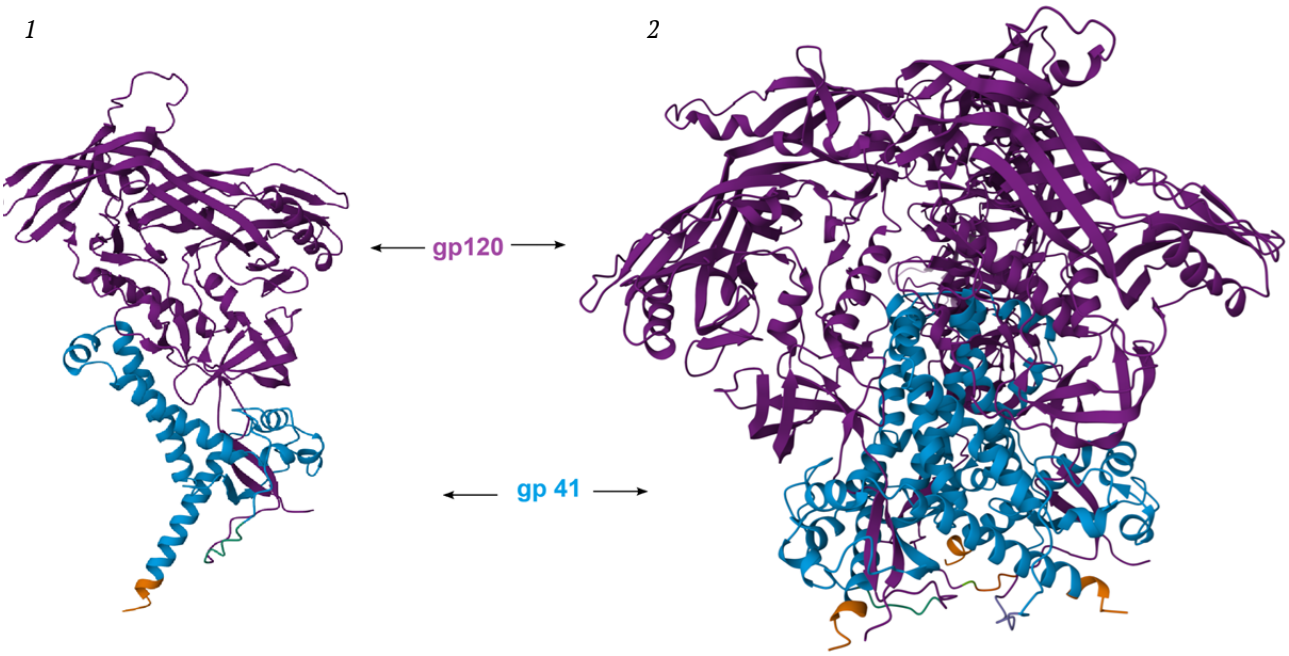
После дизайна аминокислотной последовательности стабилизированного Env-тримера ВИЧ-1 подтипа A6 была осуществлена обратная трансляция аминокислотной последовательности белка в нуклеотидную и оптимизация кодонного состава гена для экспрессии в клетках млекопитающих с использованием онлайн-инструмента Codon Adaptation Tool. После этого был проведен синтез гена коммерческой фирмой. Далее синтезированный ген клонировали в составе интеграционного плазмидного вектора для получения штамма-продуцента.

Стабильный продуцент тримера Env получали на основе клеточной линии CHO-K1. После получения поликлональной клеточной культуры CHO-K1-gp140(A6).SOSIP.664. ее использовали для наработки белка.

Очистку целевого белка осуществляли с помощью металл-хелатной афинной хроматографии. Степень очистки оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Фракции, содержащие целевой белок, диализовали и концентрировали с использованием центрифужного концентратора на 100 кДа. Антигенные свойства тримера оценивали с помощью иммуноферментного анализа с использованием моноклональных широконейтрализующих антител к ВИЧ-1.

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

© К. П. Макарова, Н. Б. Рудометова, Л. И. Карпенко, А. П. Рудометов, 2025



Модель стабилизированного Env-тримера ВИЧ-1 подтипа A6, полученная при помощи нейросети Alphafold 3 colab и модуля визуализации PDB: *1* — модель мономера; *2* — модель тримера

В результате работы спроектирован и получен стабилизированный тример Env ВИЧ-1 gp140(A6).SOSIP.664 на основе консенсусной последовательности подтипа A6, циркулирующего в Российской Федерации. Дальнейшие работы будут направлены на исследовании иммуногенных свойств полученного тримера в составе белкового иммуногена, ДНК- и мРНК-вакцин. Полученная конструкция в дальнейшем может быть использована в качестве иммуногена при разработке вакцины против ВИЧ/СПИД.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-102

СКРИНИНГ КРОВООСТАНАВЛИВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БИОКОМПОЗИТНЫХ АЭРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА *

SCREENING OF THE HEMOSTATIC ACTION OF CHITOSAN-BASED BIOCOMPOSITE AEROGELS

М. А. Макеев, М. И. Чуркин, Е. В. Паравина, Д. Н. Щербаков

Алтайский государственный университет, Барнаул

M. A. Makeev, M. I. Churkin, E. V. Paravina, D. N. Shcherbakov

Altai State University, Barnaul

✉ makeev_biomedicine@vk.com

Аннотация

В данной работе представлено получение биокомпозитного геля на основе низкомолекулярного хитозана для создания кровоостанавливающих повязок для применения в фармакологии. Методом гамма-облучения смесей хитозана с поливиниловым спиртом получены аэрогели с оптимальным соотношением компонентов 60 : 40. Установлен коэффициент набухания полученного материала 32,78 %, что свидетельствует о высокой впитывающей способности разработанной композиции.

Abstract

This work describes the production of a biocomposite gels based on low-molecular weight chitosan for the creation of hemostatic dressings for use in pharmacology. Aerogels with an optimal component ratio of 60 : 40 were obtained by gamma irradiation of chitosan mixtures with polyvinyl alcohol. The swelling coefficient of the obtained material was determined to be 32.78 %, which indicates the high absorbency of the produced composition.

Разработка кровоостанавливающих повязок на основе хитозана является одним из перспективных направлений экстремальной и военной медицины [1]. Гемостатические повязки, гели и губки на основе биоматериалов просты в применении, вызывают меньше осложнений и способствуют более быстрой остановке кровотечений по сравнению со стандартным жгутом или давящей повязкой [2].

Хитозан — это природный полисахарид, получаемый путем деацетилирования хитина из панцирей ракообразных и обладающий уникальным сочетанием биосовместимости и выраженных гемостатических свойств [3]. Повязки на основе хитозана способны приводить к формированию фибринового сгустка и остановке кровотечения менее чем за одну минуту, а также способствуют впитыванию жидкости, образующейся в ранах, обеспечивая дренирование ложа раны и минимизируя риск возникновения инфекции. В частности, высокий интерес для медицины представляют препараты низкомолекулярного хитозана за счет более высокой биодоступности, а также гелеобразные композиции на их основе [4].

Цель работы — получение гетерогенной биокомпозитной губки на основе хитозана низкой молекулярной массы и исследование его впитывающей способности.

Получение биокомпозитных губок проводили путем смешивания 1,0%-го раствора хитозана низкой молекулярной массы (не более 150 кДа) в 1,0%-й уксусной кислоте с 4%-м водным раствором поливинилового спирта.

Указанные растворы смешивали в различных соотношениях по массе, а именно: 20 : 80, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 80 : 20 (хитозан : поливиниловый спирт). Полученные смеси подвергали гамма-облучению для формирования плотных гелей. Использовали кобальтовый источник излучения, при этом общая доза облучения составила 15 кГр.

Далее выбирали образцы, сформировавшие устойчивый плотный гидрогель и содержащие максимальное количество хитозана по отношению к поливиниловому спирту. Выбранные образцы лиофилизировали для получения аэрогелевой губки.

Для определения коэффициента набухания образец губки с известной массой помещали в дистиллированную воду при температуре 30 °С на 24 ч, после чего набухший образец извлекали из жидкости, убирали избыток влаги фильтровальной бумагой и взвешивали. Коэффициент набухания определяли по процентному соотношению массы образца после набухания к изначальной массе гранул.

* Исследование выполнено в рамках программы «Приоритет-2030», проект «Разработка препаратов для регенерации».

© М. А. Макеев, М. И. Чуркин, Е. В. Паравина, Д. Н. Щербаков, 2025

По результатам исследования было установлено, что при соотношении хитозана к поливиниловому спирту более чем 60 : 40 не происходит устойчивого гелеобразования. Таким образом, максимально допустимое соотношение хитозана к поливиниловому спирту было определено как 60 : 40, и именно указанные образцы использовались при оценке коэффициента набухания.

Коэффициент набухания полученного аэрогеля составил 32,78 %.

Литература

1. Солосин В. В., Кузьмин С. А., Вяльцин С. В. и др. Организация оказания первой помощи раненым военнослужащим в зоне вооруженного конфликта // Медицина катастроф. 2024. № 3. С. 53–56.

2. Плавунов Н. Ф., Кадышев В. А., Гончарова Н. А. и др. Эффективность применения местных гемостатических средств при наружных кровотечениях выездными бригадами скорой медицинской помощи // Медицинский алфавит. 2021. Т 4 (42). С. 25–29.

3. Чарыев Ю. О., Аскеров Э. М., Рыжова Т. С. и др. Гемостатические препараты местного действия в современной хирургической практике // Тверской медицинский журнал. 2022. № 1. С. 31–41.

4. Suryani S., Chaerunisaa A. Y., Joni I. M. et al. Production of Low Molecular Weight Chitosan Using a Combination of Weak Acid and Ultrasonication Methods // Polymers. 2022. Vol. 14 (16). P. 3417.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-103

РОЛЬ ГЕНА СИНТЕТАЗЫ БАЦИЛЛИБАКТИНА В PGPR-СВОЙСТВАХ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* *

THE ROLE OF THE BACILLIBACTIN SYNTHETASE GENE IN THE PGPR PROPERTIES OF THE *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN

А. А. Мамчур, Ю. А. Васильева, Ю. В. Данилова, М. Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет

A. A. Mamchur, I. A. Vasilyeva, I. V. Danilova, M. R. Sharipova

Kazan Federal University

✉ alexandramamchur5250@gmail.com

Аннотация

Исследован ризосферный штамм *B. subtilis* AM7 и производный от него с помощью CRISPR/CAS9-технологии мутантный штамм с делецией гена синтетазы бациллибактина (ΔdhbF). По результатам исследования способности к колонизации корней и ингибированию роста фитопатогенных микроорганизмов не различались между ризосферным и мутантным штаммами *B. subtilis*. Однако мутантный штамм характеризовался снижением уровня формирования биопленок.

Abstract

The rhizosphere strain *B. subtilis* AM7 and its CRISPR/CAS9-derived mutant strain with a deletion of the bacillibactin synthetase gene (ΔdhbF) were studied. According to the results of the study, the ability to colonize roots and inhibit the growth of phytopathogenic microorganisms did not differ between the rhizosphere and mutant strains of B. subtilis. However, the mutant strain was characterized by a decrease in the level of biofilm formation.

Благодаря широкому спектру метаболических путей представителей рода *Bacillus* относят к функциональной группе PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) и используют в агробиотехнологии для получения эффективных продуцентов. PGPR-штаммы оказывают положительное влияние на повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к сложным условиям окружающей среды, благодаря эффективной колонизации, образованию протекторных биопленок на корнях растений и биосинтезу вторичных метаболитов они способствуют прямому подавлению роста фитопатогенных микроорганизмов, а также активации фитоиммунитета. Одним из важнейших метаболитов, синтезируемых *B. subtillis*, является сидерофор катехолового типа — бациллибактин, участвующий во многих моделирующих процессах, происходящих в ризосфере. В частности, бациллибактин обладает высокой хелатирующей способностью, обеспечивает конкурентное преимущество бацилл над микромицетами за биодоступные формы железа, кроме того, участвует в биоремедиации почв. Поэтому цель исследования заключалась в выяснении роли гена биосинтеза бациллибактина в проявлении PGPR-свойств ризосферного изолята *B. subtilis* AM7. В ходе работы была проведена сравнительная характеристика колонизирующей способности, биопленкообразования и антагонистических свойств ризосферного изолята *B. subtilis AM7* и мутантного штамма *B. subtilis* AM7 Δ*dhb*F.

Для определения колонизирующей способности были получены флуоресцентно-меченные штаммы *B. subtilis* путем химической трансформации вектора pJET::BC16::sfgfp. Образцы молодых растений картофеля сорта Жуковский ранний инокулировали трансформированными штаммами и культивировали совместно в течение 3 дней. Корни поместили на предметные стекла и рассматривали в синем фильтре конфокального флуоресцентного микроскопа при длине волны 490 нм, визуально оценивая расположение флуоресцентных бактериальных GFP-клеток относительно корневых структур. Клетки ризосферного изолята *B. subtilis* AM7 свободно адгезируются и проникают через ткани корня. В случае мутантного штамма *B. subtilis* AM7 Δ*dhb*F сохраняется способность клеток к колонизации и распространению по корневым волоскам (рис. 1).

Изучение динамики биопленкообразования проводилось путем измерения оптической плотности связавшегося красителя с матриксом биопленок, образованных нативным и мутантным штаммами *B. subtilis,* на протяжении 72 ч. По результатам исследования наибольшая биомасса в составе биопленки была достигнута на 48-й час инкубации в случае *B. subtilis* AM7 и на 36-й час у мутанта по гену *dhb*F. При этом плотность биопленки *B. subtilis*

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-16-00143).

© А. А. Мамчур, Ю. А. Васильева, Ю. В. Данилова, М. Р. Шарипова, 2025

AM7 превышала плотность редактированного штамма на 12,5 %. Было установлено, что мутантный штамм характеризуется снижением уровня формирования биопленок (рис. 2).

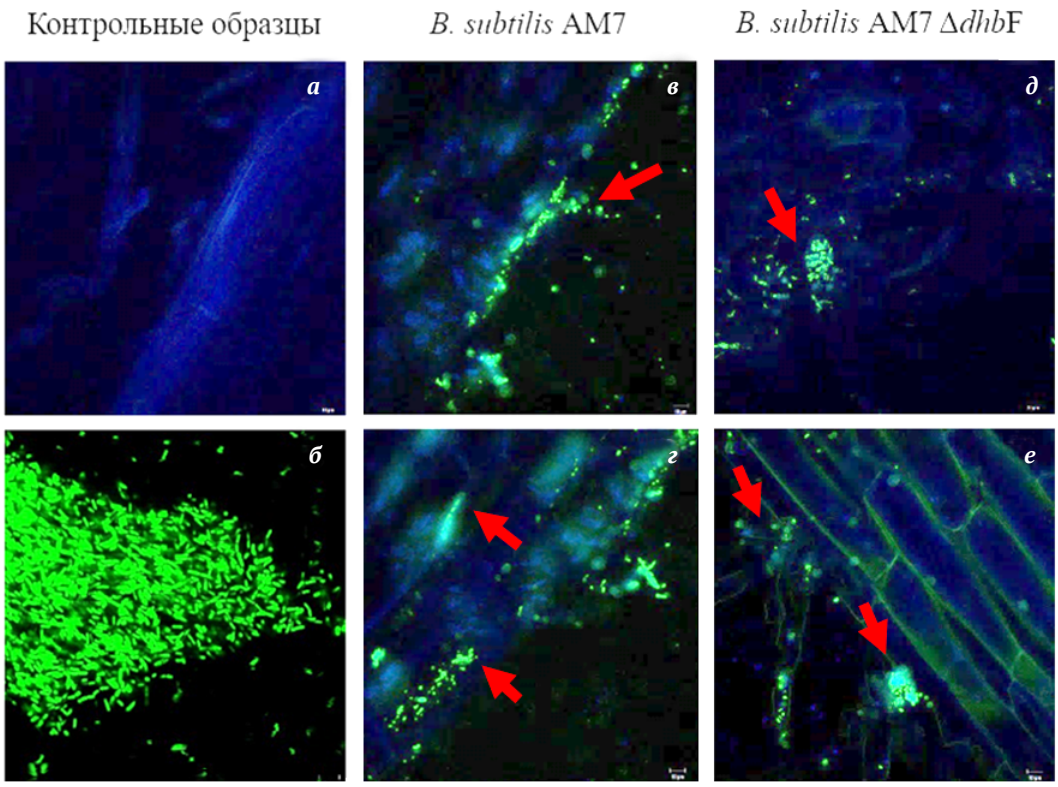


Рис. 1. Конфокальная микроскопия образцов корней картофеля с адгезированными бактериальными клетками: *а* — корень; *б* — *B. subtilis* AM7 с GFP; *в, г* — колонизация штаммом *B. subtilis* AM7; *д, е* — колонизация штаммом *B. subtilis* AM7 Δ*dhb*F

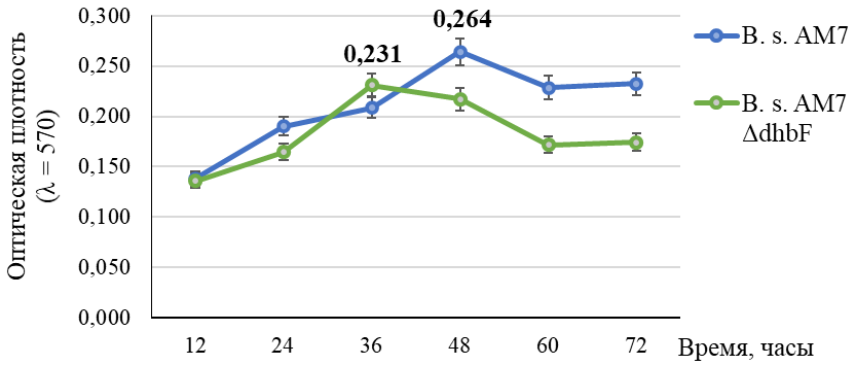


Рис. 2. Динамика формирования биопленок штаммами *B. subtilis*

Сравнение антагонистической способности исследуемых бацилл проводилось против фитопатогенных штаммов *Xanthomonas compestris* П1 и *Pectobacterium atrosepticum* Г784 на среде КГА. Во всех вариантах эксперимента способность ингибирования роста значительно не различалась между ризосферным и мутантным штаммами *B. subtilis*. Штамм *B. subtilis* AM7 эффективно сдерживал *X. compestris* П1 и *P. atrosepticum* Г784, образуя радиусы подавления роста, равные 1,85 ± 0,2 и 1,675 ± 0,1 см соответственно. В свою очередь, *B. subtilis* AM7 Δ*dhb* подавлял рост фитопатогенов на 1,91 ± 0,01 и 1,46 ± 0,05 см. Таким образом, делеция гена биосинтеза бациллибактина значительно не повлияла на антагонистическую активность ризосферного изолята.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-104

ИЗМЕНЕНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОРСКИХ ГРИБОВ — СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ*

CHANGING THE CULTIVATION CONDITIONS OF MARINE FUNGI IS A WAY TO OBTAIN NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Л. Е. Нестеренко, Е. А. Юрченко, Н. Н. Киричук, А. Н. Юрченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

L. E. Nesterenko, E. A. Yurchenko, N. N. Kirichuk, A. N. Yurchenko

G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok

✉ nesterenko_le@piboc.dvo.ru

Аннотация

Исследование влияния условий культивирования на продукцию биологически активных соединений морскими грибами-продуцентами *Penicillium hispanicum* КММ 4689, *Asteromyces cruciatus* КММ 4696, *Aspergillus fumigatus* КММ 4631 показало, что изменение таких факторов, как температура, концентрация морской соли, добавление дополнительных компонентов в среду или совместное культивирование существенно влияют на метаболический профиль грибов.

Abstract

A study of the effect of cultivation conditions on the production of biologically active compounds by marine fungi producing *Penicillium hispanicum* KMM 4689, *Asteromyces cruciatus* KMM 4696, *Aspergillus fumigatus* KMM 4631 showed that changes in factors such as temperature, sea salt concentration, the addition of additional components to the medium or co-cultivation significantly affect the metabolic profile of fungi.

Мицелиальные грибы являются ценным источником различных соединений для целей здоровьесбережения и сельского хозяйства. Из культивируемых мицелиальных грибов были получены такие лекарства, как пенициллин, цефалоспорин С, финголимод, регулятор роста растений гиббереллин, аминокислоты и органические кислоты. Исследование влияния условий ферментации на продукцию вторичных метаболитов штаммами-продуцентами является необходимым этапом разработки алгоритма биотехнологического получения ценных биологически активных соединений. Так, в ходе многочисленных исследований были подобраны оптимальные условия для культивирования штамма *Aspergillus terreus* №44-62, приводящие к максимальной продукции ловастатина — статина, применяющийся в качестве фармацевтического препарата гипохолестеролемического действия [1].

Некоторые штаммы морских грибов Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН, например *Penicillium hispanicum* КММ 4689, *Asteromyces cruciatus* КММ 4696, *Aspergillus fumigatus* КММ 4631, являются продуцентами перспективных биологически активных соединений. Цель данного исследования — изучение влияния изменения условий культивирования: температуры, концентрации морской соли, добавление дополнительных компонентов в культуральную среду или культивирование с другими штаммами — на продукцию вторичных метаболитов этих грибов.

Морской гриб *Aspergillus fumigatus* КММ 4631 является известным продуцентом 2,5-дикетопиперазиновых алкалоидов с антипролиферативным действием [2]. При совместном культивировании *A. fumigatus* КММ 4631 с *P. hispanicum* КММ 4689, *Amphichorda* sp. КММ 4639 и *Penicillium* sp. КММ 4672 метаболитные профили были сходны с монокультурами этих грибов. Однако совместное культивирование с *A. cruciatus* КММ 4696 привело к изменению метаболитного состава. В монокультуре *A. fumigatus* было обнаружено 20 известных соединений, включая индолмолочную кислоту, ранее неизвестную для этого гриба, и было детектировано большое количество пиков, которые не удалось отнести к известным соединениям [3].

Штамм морского гриба *Penicillium hispanicum* КММ 4689 является продуцентом нейропротекторных и противоопухолевых дезоксиизоаустамидных алкалоидов [4, 5]. Его культивирование при температуре 30 °С не привело к существенным изменениям по сравнению с культивированием при 22 °С, снижение концентрации морской соли приводило к уменьшению содержания дезоксиизоаустамидных алкалоидов и появлению

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2030 гг. (соглашение № 075-15-2025-467 от 30.05.2025).

© Л. Е. Нестеренко, Е. А. Юрченко, Н. Н. Киричук, А. Н. Юрченко, 2025

неидентифицированных пиков на ВЭЖХ-МС-хроматограмме, а увеличение — к большему содержанию алкалоидов [6].

Из экстракта гриба *P. hispanicum* КММ 4689, культивированного при 5 мг/мл морской соли в среде, были выделены девять соединений (рис. 1).

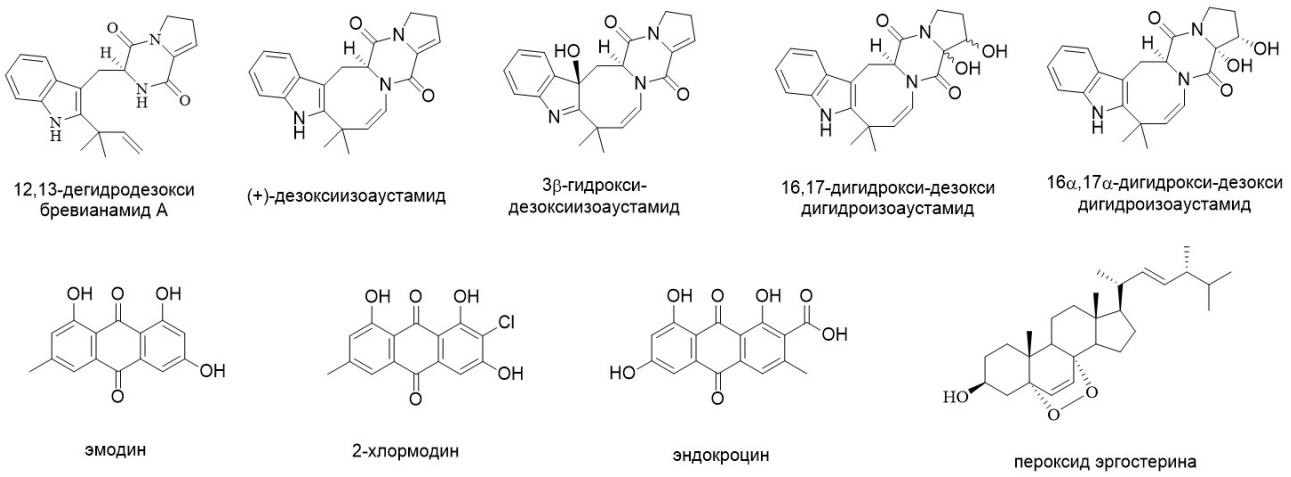


Рис. 1. Структуры выделенных соединений из гриба *P. hispanicum* КММ 4689

Выделение 12,13-дегидродезоксибревианамид Е позволило предположить, что это соединение является биогенетическим предшественником дегидрированных дезоксиизоаустамидных алкалоидов и их производных. Соединения 16α,17α-дигидрокси-дезоксидигидроизоаустамид и 16β,17α-дигидрокси-дезоксидигидроизоаустамид проявили антигипоксическое и антиишемическое действие на кардиомиоциты линии H9c2 в экспериментах *in vitro* через Keap1/Nrf2-зависимый и независимый пути.

Морской гриб *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 продуцирует две группы вторичных метаболитов: хлорсодержащие полигидроксилированные циклогексановые производные и ряд антрахинонов [7, 8]. Было изучено влияние добавления NaBr, KI и NaF в культуральную среду на продукцию этих соединений. Добавление NaBr, KI и NaF к культуре гриба существенно изменило профили ВЭЖХ-МС экстрактов. Из культуры гриба, ферментированного в присутствии KI, были выделены новые пентанорланостановые тритерпены курваларолы C и D и новый 6/6/5 антрахинон акруцихинон D (рис. 2). Курваларол C показал селективную противоопухолевую активность в отношении клеток рака молочной железы линии MCF-7, в том числе ингибировал образование их колоний с $ИК_{50}$ 4,7 мкМ.

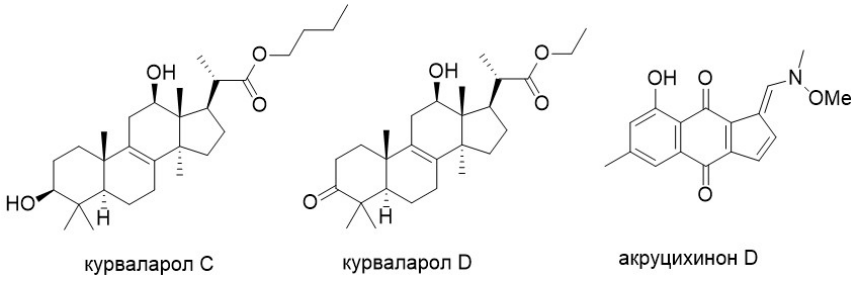


Рис. 2. Структуры новых соединений, выделенных из гриба *A. cruciatus* КММ 4696

Таким образом, полученные данные могут быть использованы для разработки оптимальных условий культивирования морских грибов с целью направленного получения ценных биологически активных соединений. Дальнейшее изучение биосинтетических путей и условий культивирования этих штаммов открывает перспективы для создания новых лекарственных препаратов.

Литература

1. Dzhavakhija V.G., Voinova T.M., Vavilova N.A. et al. Fungus strain Aspergillus terreus 44-62 as producer of lovastatin, industrial method for isolation of lovastatin and method for lactonization of statins // RU 2 261 901 C2. 2005.

2. Afiyatullov S.S., Kalinovskii A.I., Pivkin M.V. et al. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus Aspergillus fumigatus // Chemistry of Natural Compounds. 2004. Vol. 40, No. 6. P. 615–617.

3. Yurchenko A. N., Nesterenko L. E., Popov R. S. et al. The metabolite profiling of Aspergillus fumigatus KMM4631 and its co-cultures with other marine fungi // Metabolites. 2023. Vol. 13, No. 11. Art. 1138.

4. Dyshlovoy S. A., Zhuravleva O. I., Hauschild J. et al. New marine fungal deoxy-14,15-dehydroisoaustamide resensitizes prostate cancer cells to enzalutamide // Marine Drugs. 2023. Vol. 21, No. 1. Art. 54.

5. Zhuravleva O. I., Antonov A. S., Trang V. T. D. et al. New deoxyisoaustamide derivatives from the coral-derived fungus Penicillium dimorphosporum KMM 4689 // Marine Drugs. 2021. Vol. 19, No. 1. Art. 32.

6. Nesterenko L. E., Popov R. S., Zhuravleva O. I. et al. A study of the metabolic profiles of Penicillium dimorphosporum KMM 4689 which led to its re-identification as Penicillium hispanicum // Fermentation. 2023. Vol. 9, No. 4. Art. 337.

7. Zhuravleva O. I., Chingizova E. A., Oleinikova G. K. et al. Anthraquinone derivatives and other aromatic compounds from marine fungus Asteromyces cruciatus KMM 4696 and their effects against Staphylococcus aureus // Marine Drugs. 2023. Vol. 21, No. 8. Art. 431.

8. Zhuravleva O. I., Oleinikova G. K., Antonov A. S. et al. New antibacterial chloro-containing polyketides from the alga-derived fungus Asteromyces cruciatus KMM 4696 // Journal of Fungi. 2022. Vol. 8, No. 5. Art. 454.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-105

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН КОНЪЮГАТАМИ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ *

FEATURES OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS FUNCTIONING OF CUCUMBER PLANTS WITH CHITOSAN-HYDROXYCINNAMIC ACIDS CONJUGATES SEED TREATMENT UNDER OF SALT STRESS CONDITIONS

И. А. Овчинников[1], Ж. Н. Калацкая[1], В. В. Николайчук[2], К. С. Гилевская[2]

[1]*Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, Минск*
[2]*Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск*

I. A. Ovchinnikov[1], J. N. Kalatskaja[1], V. V. Nikalaichuk[2], K. S. Hileuskaya[2]

[1]*Institute of Experimental Botany NAS of Belarus, Minsk*
[2]*Institute of Chemistry of New Materials NAS of Belarus, Minsk*

✉ igor-1606@mail.ru

Аннотация

Приводятся данные об изменении функционирования фотосинтетического аппарата растений огурца в оптимальных и стрессовых условиях выращивания (натрий-хлоридное засоление) при применении конъюгированных соединений на основе хитозана и оксикоричных кислот.

Abstract

Data on changes of the photosynthetic apparatus functioning of cucumber plants cultivation under optimal and stressful conditions (sodium chloride salinization) with chitosan-hydroxycinnamic acids conjugates seed treatment are presented.

Засоление является одним из самых губительных стрессов абиотической природы, влияющих на рост и развитие растений. Растения, выращенные в условиях повышенного солесодержания, испытывают разнообразные морфофизиологические и биохимические изменения из-за осмотического стресса, что, в свою очередь, приводит к повреждению мембран, дисбалансу питательных веществ, падению эффективности фотосинтеза и др. [1]. В связи с этим актуальным остается изучение способов повышения активности фотосинтеза и продуктивности растений в стрессовых условиях.

Целью данной работы являлось изучение влияния обработки семян огурца конъюгатами хитозана и кофейной кислоты (Х30-КФК) или феруловой кислоты (Х30-ФРК) на функционирование отдельных элементов фотосинтетического аппарата в оптимальных и стрессовых (NaCI) условиях выращивания.

Семена обрабатывали путем механического перемешивания в растворах конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами в объеме 400 мкл на 20 г семян до равномерного распределения раствора по поверхности. Контролем служили необработанные семена. Растения выращивали в горшках объемом 3,5 литра на торфогрунте с добавлением элементов питания: N 0,16; P 0,15; K 0,15 г/л. Продолжительность эксперимента — 5 недель. Солевой стресс создавали прикорневым поливом 100 мМ раствором хлорида натрия в течение 2 недель (3–4-я неделя роста) на стадии 2–3 настоящих листьев. Конъюгаты хитозана с феруловой и кофейной кислотой (Х30-ФРК и Х30-КФК) получали карбодиимидным методом с предварительной активацией карбоксильных групп [2]. Содержание фотосинтетических пигментов определяли методом [3], фотохимическая активность фотосистем (ФС) листьев растений фиксировалась с помощью измерительного комплекса DUAL-PAM 100 (Heinz Walz, Германия), параметры активности ФС1 и ФС2 листьев рассчитывали согласно [4].

Конъюгаты Х30-ФРК и Х30-КФК оказывали на растения огурца ростостимулирующий эффект как в оптимальных условиях, так и в условиях солевого стресса. В оптимальных условиях обработка конъюгатами способствовала накоплению хлорофиллов *a* и *b*. Солевой стресс не вызвал достоверно значимых изменений в содержании хлорофиллов в контрольных растениях. В условиях стресса Х30-ФРК способствовал снижению содержания хлорофилла *a*, содержание хлорофилла *b* оставалось на уровне стрессового контроля, Х30-КФК, напротив, способствовал накоплению хлорофилла *b*, в то же время содержание хлорофилла *a* оставалось на уровне

* Исследование выполнено за счет гранта БРФФИ (№ Б25М-029).

© И. А. Овчинников, Ж. Н. Калацкая, В. В. Николайчук, К. С. Гилевская, 2025

стрессового контроля. Количественные показатели накопления каротиноидов во всех вариантах опыта были на уровне контроля.

Конъюгаты Х30-ФРК и Х30-КФК не вызвали изменения уровня фоновой флуоресценции Хл (F_0) и максимального уровня флуоресценции *Fm* адаптированных к темноте листьев растений. Однако зарегистрировано увеличение для уровня сигнала Р700 (параметры *Pm* и *Pm'*) в среднем на 56 %. Установлено, что засоление приводит к достоверному снижению на 12 % уровня фоновой флуоресценции Хл (F_0) и на 10 % максимального уровня флуоресценции *Fm* адаптированных к темноте листьев растений огурца. Однако выявлено увеличение для уровня сигнала Р700 (параметры *Pm* и *Pm'*) на 80 %. В условиях стресса обработки не привели к изменению уровней *F0, Fm, Pm и Pm'*. Установлено, что Х30-ФРК и Х30-КФК способствуют возрастанию скорости транспорта электронов ETR (I/II) как в оптимальных, так и в стрессовых условиях развития растений.

Показано, что действие конъюгатов на основе хитозана и оксикоричных кислот вызывает в фотосинтетических мембранах листьев растений огурца изменения, связанные с перераспределением энергии между фотосистемами, вероятно, за счет миграции светособирающих комплексов внешней антенны, на что указывает отсутствие нарушения фотохимической активности фотосистем 1 и 2, а также увеличение содержания хлорофиллов *a* и *b*.

Литература

1. Negrão S., Schmöckel S. M., Tester M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress // Annals of Botany. 2017. Vol. 119, No. 1. P. 1–11.

2. Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A. et al. Chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates: Synthesis, photostability and phytotoxicity to seed germination of barley // Journal of Applied Polymer Science. 2021. Vol. 139, No. 14. P. e51884.

3. Hartmut K. L., Alan R. W. Determination of total and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // Biochemical Society Transactions. 1983. Vol. 11. P. 591–592.

4. Makarenko M. S. et al. A state of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant // OnLine Journal of Biological Sciences. 2016. Vol. 16, No. 4. P. 193–196.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-106

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЦИСТ АРТЕМИИ

OBTAINING METHOD AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CHITOSAN PRODUCED FROM THE WASTES OF ARTEMIA CYSTS PROCESSING

Н. А. Омелько, Д. Н. Щербаков, Р. И. Халимов

Алтайский государственный университет, Барнаул

N. A. Omelko, D. N. Shcherbakov, R. I. Khalimov

Altai State University, Barnaul

✉ asu.nii@mail.ru

Аннотация

Хитозан активно применяется в различных отраслях, что делает актуальным поиск новых способов его получения. В работе был продемонстрирован способ получения хитозана из некондиционных цист рачка артемии, а также определены молекулярная масса и степень деацетилирования полученного продукта. Полученный хитозан имел форму порошка желтого цвета, степень деацетилирования составила 92 %, а средняя молекулярная масса — 164 кДа.

Abstract

Chitosan is widely used in various industries, which makes it important to search for new methods of producing it. The work demonstrated a method for obtaining chitosan from substandard Artemia crustacean cysts, and also determined the molecular weight and degree of deacetylation of the obtained product. The chitosan so produced had the form of a yellow powder, the degree of deacetylation was 92 %, and the average molecular weight was 164 kDa.

Хитозан — это биополимер, который содержится в грибах и покровах членистоногих, в частности, он содержится в цистах рачков артемии и гаммаруса [1, 2]. Хитозан является вторым по распространенности в природе биополимером после целлюлозы. Хитозан является ценным продуктом, способным к биодеградации в природных условиях. В настоящее время хитозан находит свое применение в ряде отраслей, включая текстильную, пищевую, медицинскую и аграрную. Вышеперечисленные достоинства делают актуальным поиск новых источников сырья, которое можно использовать для получения хитозана, и разработку способов получения хитозана из них [3].

В работе для получения хитозана использовали отходы цист артемии. Отходы представляют собой некондиционную цисту артемии, непригодную для выведения рачков.

Для получения хитозана цисту артемии деминерализировали 7,5%-й соляной кислотой, используя модуль ванны 1 : 15. При использовании модуля ванны менее 1 : 15 цисты скапливаются на поверхности раствора и плохо обрабатываются в соляной кислоте, что может приводить к снижению качества и выхода получаемого хитозана. Деминерализацию проводят при постоянном перемешивании и комнатной температуре в течение 3 ч. Далее цисты промывают через тканевый фильтр до pH = 7 промывных вод. Затем цисты засыпают в колбу, снабженную мешалкой, и заливают 5%-м раствором гидроксида натрия для депротеинизации и обезжиривания, соблюдая модуль ванны 1 : 15. Депротеинезацию проводят путем кипячения указанного раствора в течение 2 ч. Далее цисту повторно промывают через тканевый фильтр до pH = 7 промывных вод. Полученный хитин обесцвечивают 3%-м раствором перекиси водорода от 3 до 5 ч и более, если хитин не обесцветился до бледно-желтого цвета. После обесцвечивания хитин промывают на фильтре до нейтрального pH промывных вод.

Полученный хитин погружают в колбу с мешалкой и наливают 47%-й раствор гидроксида натрия, соблюдая модуль ванны 1 : 20. Деацетилирование проводят путем кипячения цист в указанном растворе в течение 2 ч, при этом из-за высокой концентрации гидроксида натрия достигается температура 120–130 °C. После этого промывают полученный хитозан дистиллированной водой до нейтрального pH промывных вод и сушат на воздухе.

У полученного хитозана определялась молекулярная масса вискозиметрическим методом и степень деацетилирования методом кондуктометрического титрования [4, 5].

Полученный хитозан имел форму порошка желтого цвета, степень деацетилирования составила 92 %, а средняя молекулярная масса — 164 кДа.

© Н. А. Омелько, Д. Н. Щербаков, Р. И. Халимов, 2025

Литература

1. Новиков В. Ю., Чеботок Е. Н. Способ получения хитозана из панцирей ракообразных. 2008.

2. Солдатова С. Ю. Разработка технологии получения хитозана из панцирьсодержащего сырья // Вестн. Нижневарт. гос. ун-та. 2015. С. 48–56.

3. Серова О. В., Политаева Н. А. Получение биоразлагаемого продукта на основе хитозана // Неделя науки ИСИ. 2 Newton. С. 359–362.

4. Мукатова М. Д., Киричко Н. А., Романенкова Е. Н. Качественные характеристики хитина и хитозана, полученных из панцирьсодержащих отходов речных раков // Вестн. Мурм. гос. техн. ун-та. 2015. Т. 18 (4). С. 641–646.

5. Колсанова Е. В., Орозалиев Э. Э., Шиповская А. Б. Вискозиметрические свойства растворов хитозана в уксусной кислоте и натрий ацетатном буфере // Изв. Сарат. ун-та. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2014. Т. 14 (2). С. 5–9.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-107

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ХАСЕКИ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ *

DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS OF THE HASEKI TICK VIRUS SUITABLE FOR STRUCTURAL RESEARCH

И. А. Осинкина, А. В. Гладышева

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

I. A. Osinkina, A. V. Gladysheva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ osinkinai_ia@vector.nsc.ru

Аннотация

Изучение новых вирусов, одним из которых является вирус Хасеки, — важная часть системы противодействия вирусным угрозам. При этом рентгеноструктурный анализ (РСА), хотя и способен помочь в изучении неизвестных белков новых вирусов, требует особого подхода в их получении. В данном исследовании был разработан комплекс биотехнологических решений, позволяющий получить рекомбинантные белки вируса Хасеки, пригодные для проведения структурных исследований.

Abstract

The study of new viruses, one of which is the Haseki tick virus, is an important part of the system for preventing viral threats. However, X-ray crystallography, while useful for studying unknown proteins from new viruses, requires a specific approach for obtaining them. In this study, a set of biotechnological solutions was developed to produce recombinant Haseki virus proteins suitable for X-ray structural analysis.

Изучение новых вирусов, потенциально патогенных для человека, — важный этап противодействия вирусным угрозам. Вирус Хасеки, отнесенный к семейству *Flaviviridae*, — недавно обнаруженный вирус с показанными случаями заражения людей. Строение его генома отличается от типичных представителей семейства, что затрудняет его изучение методами молекулярно-генетического анализа, в связи с чем до настоящего момента геном вируса оставался неаннотированным [1].

В ходе выполнения работы посредством построения скрытой марковской модели с помощью HMMER v3.1b2, а также моделирования с применением AlphaFold3 участков полипротеина вируса Хасеки были впервые обнаружены домены неструктурных белков: NS3 протеазы и геликазы (1598–1801 и 1802–2291 а. о.) и NS5 RdRp (3999–4709 а. о.), а также неизвестные высокоструктурированные домены SP1 и SP2 в позициях 1–173 и 672–831 а. о., предположительно связанные с белком Erns и гликопротеином оболочки. Однако все обнаруженные домены имеют уровень гомологии ниже 30 % с белками представителей семейства, что исключает возможность их точной идентификации [2].

РСА способен помочь в идентификации и изучении этих белков, однако требует их получения в нативной конформации, большой концентрации с чистотой более 95 %, что вызвало необходимость разработки технологической платформы для получения рекомбинантных белков вируса Хасеки, пригодных для структурных исследований.

ПЦР-сборкой с перекрытием были *de novo* собраны ДНК-копии последовательностей, кодирующих белки SP1 (474 н. п.), SP2 (450 н. п.), NS3 (2082 н. п.), NS3pro (612 н. п.) и NS3hel (1470 н. п.) вируса Хасеки. На их основе получены устойчивые генетические конструкции pJET1.2/SP1, -SP2, PUC19/SP1, -SP2, -NS3, -NS3pro и -NS3hel, для хранения ДНК-копий последовательностей белков. Путем переклонирования были созданы рекомбинантные плазмидные ДНК pET/SP1; 14x-His-Tev-SP1; pEASY/SP1, -SP2; pET28b/SP1, -SP2, -NS3pro, -NS3hel, предназначенные для продукции рекомбинантных химерных белков в системе *E. coli*. Конструкции содержат аффинную метку, метки для повышения растворимости и сайт протеолиза пикорнаином 3c риновируса A28, что обеспечивает возможность получения высокоочищенных белков, пригодных для структурных исследований (см. рисунок).

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2025-452 от 30.05.2025).

© И. А. Осинкина, А. В. Гладышева, 2025

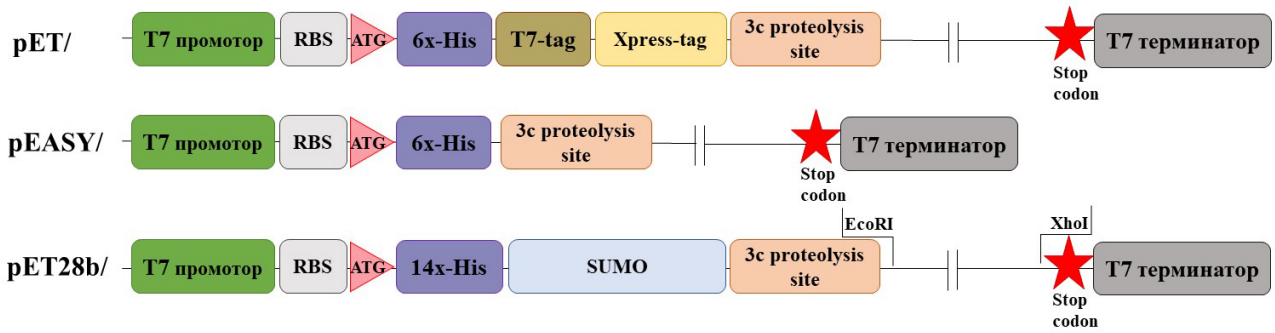


Схема строения экспрессионных кассет полученных плазмидных ДНК

Мы использовали различные штаммы клеток *E. coli* — BL-21(DE3), KRX, HyperStable, LysTech и T7EvoPro — для сравнения эффективности наработки в них рекомбинантных белков вируса Хасеки. Были получены штаммы-продуценты BL/pET/SP1, KRX/pET/SP1, BL/pEASY/SP1, KRX/pEASY/SP1, HS/pEASY/SP1, BL/Tev-SP1, KRX/Tev-SP1, HS/Tev-SP1, T7Evo/Tev-SP1, LT/Tev-SP1, BL/pEASY/SP2, KRX/pEASY/SP2, HS/pEASY/SP2, BL/pET28b/SP2, KRX/pET28b/SP2, HS/pET28b/SP2, обеспечивающие синтез рекомбинантных химерных белков SP1 и SP2.

При культивировании штаммов BL/pET/SP1 и KRX/pET/SP1 в течение 20–22 ч при 20 °C и 180 об/мин с индукцией 1 мМ ИПТГ (+0,1 % L-рамнозы для штамма KRX/) наблюдался высокий уровень наработки рекомбинантного белка SP1 (26 кДа), в растворимой форме в периплазме бактериальных клеток. Удалось получить до 12,7 г биомассы клеток с 1 л культуры. При культивировании штаммов, содержащих конструкции на основе pEASY/ и pET28b/ в описанных ранее условиях, а также при варьировании температуры от 16 до 37 °C и концентрации ИПТГ от 0,1 до 2 мМ не наблюдалась наработка целевых белков; в штаммах, содержащих конструкции 14x-His-Tev-SP1, наработка белка происходила в тельцах включения, что неприменимо для работ по кристаллизации белка и проведении РСА.

Рекомбинантный белок SP1 был выделен из лизата клеток BL/pET/SP1 и KRX/pET/SP1 и очищен с помощью ионообменной (в градиенте pH) и эксклюзионной хроматографии. Чистота препарата белка составила < 95 % по SDS-PAGE с концентрацией 32 мг/мл. Соответствие требуемым параметрам подтверждается успешно проведенными экспериментами по измерению малоуглового рентгеновского рассеяния и динамического рассеяния света.

Таким образом, разработанная технологическая платформа позволяет получать рекомбинантные белки вируса Хасеки, пригодные для проведения структурных и функциональных исследований, что может в дальнейшем способствовать разработке вакцин и иммунобиологических препаратов.

Литература

1. Kartashov M. Y., Gladysheva A. V., Shvalov A. N. et al. Novel Flavi-like virus in ixodid ticks and patients in Russia // Tick Borne Diseases. 2023. No. 14 (2). P. 70.

2. Gladysheva A. V, Osinkina I. A., Radchenko N. S. et al. Tertiary Structures of Haseki Tick Virus Nonstructural Proteins Are Similar to Those of Orthoflaviviruses // Int. J. Mol. Sci. 2024. No. 25 (24). P. 13654.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-108

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА *

STUDY OF THE GENETIC STABILITY OF THE ANALGESIC PEPTIDE PRODUCER STRAIN

А. П. Павленко[1,2], А. Н. Кветкина[2], Е. В. Лейченко[1,2]

[1] *Передовая инженерная школа Дальневосточного федерального университета, Владивосток*
[2] *Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток*

A. P. Pavlenko[1,2], A. N. Kvetkina[2], E. V. Leychenko[1,2]

[1] *Advanced Engineering School, Far Eastern Federal University, Vladivostok*
[2] *G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok*

✉ apavlenko141@gmail.com

Аннотация

Разработка новых, более эффективных, обезболивающих препаратов, обладающих высоким сродством к биологическим мишеням, является актуальной задачей. Кандидатом для разработки нового анальгетического препарата стал пептид морской анемоны *Heteractis magnifica* HCRG21, блокатор TRPV1-канала. В рамках работы были проведено исследование генетической стабильности штамма-продуцента гибридного белка SMT3_HCRG21.

Abstract

The development of new, more effective painkillers with high affinity for biological targets is an urgent task. A promising candidate for a new analgesic drug is the peptide HCRG21, a TRPV1 channel blocker from the sea anemone *Heteractis magnifica*. In this work, the genetic stability of the strain producing the SMT3_HCRG21 hybrid protein was studied.

Одной из важнейших прикладных задач современной биотехнологии является разработка эффективных способов получения ценных биологически активных соединений. Биотехнологические методы позволяют как получать вещества в лабораторных условиях — для изучения их свойств и выявления кандидатов в лекарственные средства, — так и масштабировать процесс для получения биологически активных соединений в количествах, достаточных для проведения клинических испытаний и производства активных фармацевтических субстанций.

В настоящее время актуальной задачей является разработка обезболивающих препаратов, так как арсенал современных анальгетиков ограничен опиоидами, нестероидными противовоспалительными средствами и аналогами ГАМК, которые либо недостаточно эффективны, либо обладают серьезными побочными эффектами. Кандидатом для разработки нового обезболивающего препарата стал пептид HCRG21, обнаруженный нами ранее в морской анемоне *Heteractis magnifica*. Было показано, что HCRG21 проявляет анальгетическую активность и является блокатором TRPV1-канала [1–4]. Известно, что антагонисты TRPV1 предотвращают боль, блокируя рецепторы на чувствительных нейронах и вызывая тем самым длительную анальгезию, что делает их реальной альтернативой традиционным анальгетикам [5]. Вещества пептидной природы обладают рядом преимуществ, таких как низкая иммуногенность и высокое сродство к биологическим мишеням. Более того, благодаря развитию генно-инженерных методов стало возможно получать пептидные препараты путем гетерологичной экспрессии.

Важными биотехнологическими этапами при производстве лекарственного препарата являются создание штамма-продуцента, определение его генетической стабильности и наработка экспериментального образца. Часто используемым организмом-хозяином для проведения гетерологичной экспрессии пептидов выступает *Escherichia coli* благодаря низкой стоимости, высокому уровню экспрессии и простоте условий культивирования с возможностью изменения различных параметров с целью оптимизации производственного процесса. Для создания штамма-продуцента анальгетического пептида был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3). Клетки штамма были трансформированы плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую гибридный белок, в который входят гексагистидиновая метка, белок-партнер SMT3 и пептид HCRG21. SMT3 распознается и выщепляется специфической протеазой Ulp1, применение которой, в отличие от часто используемого в лабораторной практике бромциана, позволит использовать получаемый пептид в медицинских целях.

* Исследование выполнено за счет средств субсидии федерального бюджета в рамках реализации Программы развития Дальневосточного федерального университета в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© А. П. Павленко, А. Н. Кветкина, Е. В. Лейченко, 2025

В результате трансформации был получен штамм-продуцент BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21 [6, 7], для которого были проведены испытания по определению генетической стабильности. Показано, что при последовательных пересевах в пределах 140 генераций количество жизнеспособных клеток культуры штамма и биосинтетическая активность культуры, определяемая количеством гибридного белка, остаются стабильными и во всех клонах присутствует пДНК, содержащая SMT3_HCRG21-кодирующую последовательность.

Таким образом, полученный штамм-продуцент выдержал необходимые испытания и будет использован для дальнейшего производства активной фармакологической субстанции анальгетического пептида HCRG21.

Литература

1. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E. et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone Heteractis crispa is a full antagonist of the TRPV1 receptor // Marine Drugs. 2016. Vol. 14, No. 12. P. 229–249.

2. Синцова О. В., Паликов В. А., Паликова Ю. А. и др. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 493, № 1. С. 423–426.

3. Sintsova O., Gladkikh I., Klimovich A. et al. TRPV1 blocker HCRG21 suppresses TNF-α production and prevents the development of edema and hypersensitivity in carrageenan-induced acute local inflammation // Biomedicines. 2021. Vol. 9, No. 7.

4. Лейченко Е. В., Синцова О. В., Гладких И. Н. и др. Средство пролонгированного анальгетического действия: патент PCT/RU 2021/050133, WO 2021/235983 A1; опубл. 25.11.2021.

5. Salat K., Moniczewski A., Librowski T. Transient receptor potential channels — emerging novel drug targets for the treatment of pain // Current Medicinal Chemistry. 2013. Vol. 20. P. 1409–1436.

6. Tereshin M. N., Komyakova A. M., Stepanenko V. N. et al. Optimized method for the recombinant production of a sea anemone's peptide // Mendeleev Communications. 2022. Vol. 32, No. 6. P. 745–746.

7. Терешин М. Н., Степаненко В. Н., Лейченко Е. В. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК pSMT3_HCRG21, кодирующая гибридный белок SMT3-HCRG21, штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21 — продуцент анальгетического пептида HCRG21 и способ получения рекомбинантного анальгетического пептида HCRG21: патент РФ 2798545; дата приоритета 03.10.2022.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-109

КОМБИНИРОВАННАЯ СТРАТЕГИЯ: БАКТЕРИОФАГИ И ПРОБИОТИКИ ПРОТИВ ЭНТЕРОПАТОГЕНОВ

PROBIOTIC–PHAGE COMBINATION THERAPY: TOWARD NEXT-GENERATION GUT INFECTION PREVENTION

М. А. Пасивкина[1], Е. С. Зубкова[1], М. Н. Анурова[1,2], А. И. Лаишевцев[1,3]

[1]Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
[3]Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, Москва

M. A. Pasivkina[1], E. S. Zubkova[1], M. N. Anurova[1,2], A. I. Laishevtsev[1,3]

[1]G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology
[2]I. M. Sechenov First Moscow State Medical University
[3]Federal Research Center — All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Y. R. Kovalenko RAS, Moscow

✉ pasivkina@gabrich.ru

Аннотация

Выделено и охарактеризовано по два новых вирулентных бактериофага к диареегенной *E. coli* (также активны в отношении *Shigella flexneri* и *Shigella sonnei*) и *Salmonella enterica*. Выделено и охарактеризовано 3 новых пробиотических штамма-антагониста энтеропатогенов *Lactobacillus spp.* Проверена биосовместимость активных компонентов, охарактеризована *in vitro* эффективность прототипа профилактического продукта.

Abstract

2 new virulent bacteriophages to diarrheagenic *E. coli* and *Salmonella enterica* were isolated and characterized. 3 new probiotic Lactobacillus strains-antagonists to enteropathogens were isolated and characterized. The biocompatibility of active components was tested, and the *in vitro* efficacy of the prototype prophylactic product was characterized.

Целью исследования является разработка лечебно-профилактического продукта на основе вирулентных бактериофагов и пробиотических штаммов *Lactobacillus spp.*, эффективных при дисбиотических нарушениях и острых кишечных инфекциях. Выбор *E. coli,* Shigella spp. и *Salmonella enterica* (*S.* Typhimurium, *S.* Enteriditis, *S.* Infantis) в качестве целевых бактерий обусловлен статистически значимой высокой распространенностью среди высеваемых энтеропатогенов.

Обозначенная ВОЗ в мировом масштабе проблема антимикробной резистентности представляет собой серьезный вызов для систем здравоохранения, в связи с чем актуальны поиск и внедрение новых альтернативных антибиотикотерапии методов противодействия патогенным бактериям. Среди таких решений значимую роль играют вирусы бактерий и пробиотические микроорганизмы.

В ходе работ из биологического материала (сточные воды, почва, навоз) было выделено 5 эшерихиозных бактериофагов и 6 сальмонеллезных бактериофагов. По мере изучения морфологических, молекулярно-генетических свойств, параметров взаимодействия фаг — клетка, чувствительности к инактивирующему действию физических и химических агентов (температура, буферные растворы с различными значениями pH, хлороформ) было выделено 4 наиболее производственно-перспективных фага (см. таблицу).

Пробиотические штаммы *Lactobacillus acidophilus, L. helveticus, L. rhamnosus* были выделены из биологического материала, полученного от здоровых людей. Идентификация до вида была проведена при помощи 16S-рРНК-секвенирования. Фено- и генотипические характеристики лактобацилл, а также безопасность (токсигенность, токсичность, безвредность, вирулентность и наличие дерматонекротических свойств) были изучены согласно МУК 4.2.2602-10 [1].

Биосовместимость выделенных и описанных агентов изучали при смешивании в жидком и лиофилизированном состоянии. При смешивании консорциума лактобацилл и их метаболитов с суспензией бактериофагов в 0,9 % NaCl, активность пробиотических микроорганизмов не падала, в то время как титр вирусных частиц

© М. А. Пасивкина, Е. С. Зубкова, М. Н. Анурова, А. И. Лаишевцев, 2025

снижался до 0 в течение 24 ч. Соединение лиофилизированных компонентов позволило получить стабильную во времени (6 месяцев) комбинацию, сохраняющую антибактериальную активность.

Характеристики выделенных бактериофагов

Характеристики		**vB_SenM-G1m**	**vB_SenM-P5nasl26**	**vB_EcoM-Ec13-52**	**vB_EcoP-Huge**
Целевые бактерии		*S.* Typhimurium, *S.* Enteriditis, *S.* Infantis	*S.* Typhimurium, *S.* Enteriditis, *S.* Infantis	*E. coli*	*E. coli, Sh. flexneri, Sh. sonnei*
Спектр литической активности, %		80	80	70	65
		95		85	
Морфология колоний		1,5–2 мм с ореолом 1 мм с ровными краями	1 мм с ореолом 3–4 мм с ровными краями	1 мм с небольшим мутным ореолом	3,0 мм с ореолом 5–6 мм с ровными краями
Параметры взаимодействия фаг — клетка		Адсорбция: 5 min 98 % Латентный период: 20 min Выход на 1 клетку: 157	Адсорбция: 3 min 97,6 % Латентный период: 20 min Выход на 1 клетку: 110	Адсорбция: 12 min 99,49 % Латентный период: 40 min Выход на 1 клетку: 79	Адсорбция: 1,5 min 98 % Латентный период: 30 min Выход на 1 клетку: 90
Стабильность, 30 дней	T, °C	–80…+25	–80…+25	–80…+25	–80…+25
	pH	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0
	$CHCl_3$	+	+	+	+

In vitro эффективность полученного прототипа профилактического продукта была изучена путем совместного культивирования бактериофагов, лактобацилл и патогенов (*E. coli, S. enterica*) в течение 6 ч с последующим высевом на селективные среды. Результаты эксперимента показали, что противомикробное действие разработанной комбинации было выше, чем отдельные эффекты фагов и пробиотиков.

Полученные результаты подтверждают потенциал применения фаго-пробиотической комбинации в качестве инновационного средства профилактики энтеропатогенных инфекций. В ходе проведенных исследований сконструированный продукт показал свою *in vitro* эффективность. На следующем этапе планируется проведение *in vivo* исследований на мышиных моделях сальмонеллеза и колибактериоза для комплексной оценки профилактической эффективности, безопасности и влияния на состав кишечной микробиоты.

Литература

1. МУК 4.2.2602-10. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: методические указания. Утв. Роспотребнадзором 21.04.2010. М.: Роспотребнадзор, 2011. С. 80.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-110

ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ЭКСПРЕССИРУЕМОГО АДЕНОВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА ТИПА В ЗА СЧЕТ МОДИФИКАЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ДОМЕНА

ENHANCEMENT OF THE IMMUNOGENICITY OF INFLUENZA B VIRUS HEMAGGLUTININ EXPRESSED BY AN ADENOVIRAL VECTOR BY MODIFYING THE CYTOPLASMIC DOMAIN

К. А. Первойкина, Е. Д. Авдонина, Э. А. Евграфова, Д. Н. Щербинин

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

K. A. Pervoykina, E. D. Avdonina, E. A. Yevgrafova, D. N. Shcherbinin

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ uk-ru123@yandex.ru

Аннотация

Вирус гриппа типа В — социально значимый патоген, который часто вызывает осложнения у людей из групп риска. Несмотря на вакцинопрофилактику, наблюдается высокая ежегодная заболеваемость, что свидетельствует о целесообразности разработки новых вакцин. В работе было решено объединить преимущества вирусоподобных частиц и аденовирусной платформы, взяв в качестве антигена гемагглютинин дикого типа вируса гриппа B/Washington/02/2019.

Abstract

Influenza type B virus is a socially significant pathogen that often causes complications in people from risk groups. Despite vaccination, there is a high annual incidence, which indicates the feasibility of developing new vaccines. In the work, it was decided to combine the advantages of virus-like particles and the adenovirus platform, taking the wild-type hemagglutinin of the influenza B virus/Washington/02/2019 as an antigen.

Введение

Вирус гриппа типа В вызывает серьезное заболевание и частые осложнения у детей и пожилых людей [1]. Высокая ежегодная заболеваемость гриппом даже при наличии вакцин указывает на актуальность разработки новых профилактических средств.

Magnus A. G. Hoffmann с соавторами предложили перспективную технологию создания вакцин [2]. Авторы заменили цитоплазматическую часть S-антигена SARS-CoV2 на ESCRT- и ALIX-связывающую область (EABR), привлекающую компоненты эндосомального сортирующего комплекса, необходимого для транспорта (ESCRT), а также добавили EPM (мотив предотвращения эндоцитоза) для уменьшения эндоцитоза. Результаты показали, что такой антиген обладает большей иммуногенностью в сравнении с обычным S-антигеном. В нашей работе было решено применить эту технологию для увеличения иммуногенности рекомбинантного аденовирусного вектора, экспрессирующего гемагглютинин (HA) вируса гриппа типа В.

Результаты

В качестве исходного гена HA для дальнейших модификаций был выбран гемагглютинин вируса гриппа B/Washington/02/2019 (рис. 1, *а*). Ген гемагглютинина дикого типа (HA-WT) был клонирован в челночную плазмиду pShuttle-CMV из набора AdEazy Adenoviral vector system (Stratagen, США) общелабораторными методами молекулярного клонирования. Таким образом была получена плазмида pShuttle-CMV-HA-WT. Рекомбинантный аденовирус Ad5-HA-WT был получен согласно протоколу производителя.

Последовательность, способствующая самоорганизации VLP, создана *in silico*: часть цитоплазматического домена на С-конце HA заменили на последовательности EPM, глицин-сериновый линкер и EABR (см. рис. 1, *б*). Сборку последовательности проводили блочным методом как описано Lei Young и Qihan Dong [3] (см. рис. 1, *в*). Рекомбинантный аденовирус Ad5-HA-VLP получен как описано выше.

В работе проведено сравнение двух вирусных векторов после интраназальной иммунизации лабораторных мышей Ad5-HA-WT и Ad5-HA-VLP в дозе 2×10^7 БОЕ/мышь в объеме 50 мкл. Контрольной группе мышей вводили PBS (pH 7,4). На 28-й день после аденовирусной иммунизации отбирали сыворотки крови мышей и выявляли специфические антитела к HA методом ИФА (рис. 2).

© К. А. Первойкина, Е. Д. Авдонина, Э. А. Евграфова, Д. Н. Щербинин, 2025

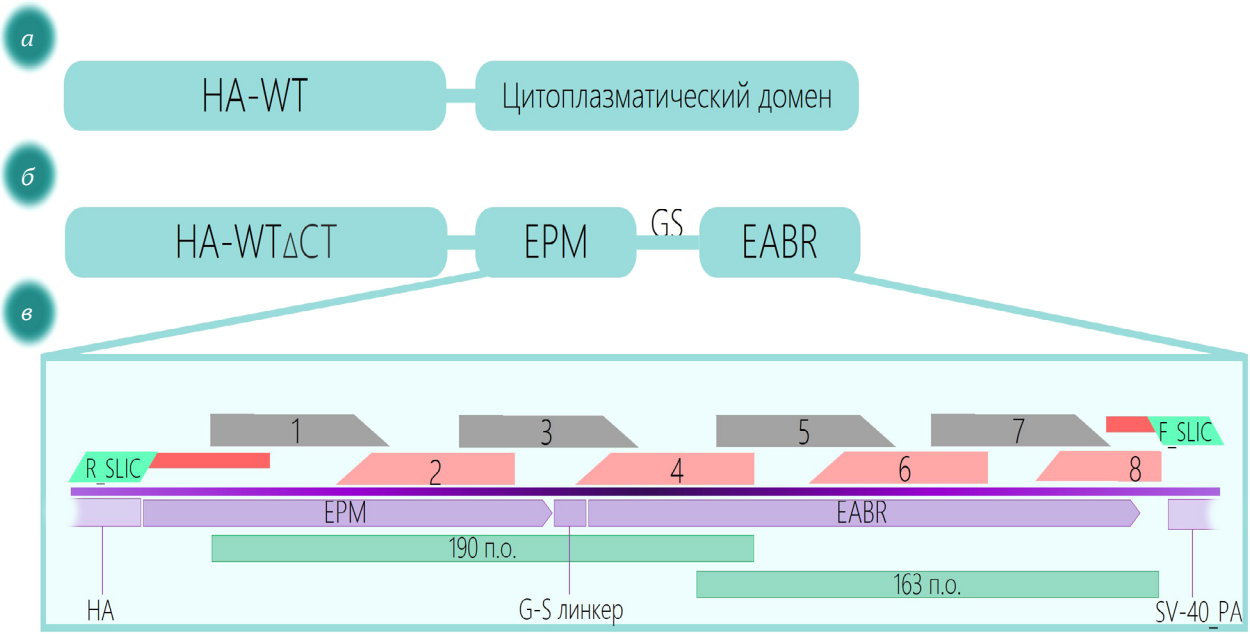


Рис. 1. Схематичное изображение HA дикого типа (*а*) и с делетированным цитоплазматическим доменом (HA-WTΔCT) (*б*). Схема получения нуклеотидной последовательности химерного HA с новым цитоплазматическим доменом путем объединения нуклеотидных блоков 190 и 163 п. о., полученных с помощью амплификации четырех праймеров (*в*). Прямые праймеры окрашены *серым*, обратные — *розовым*

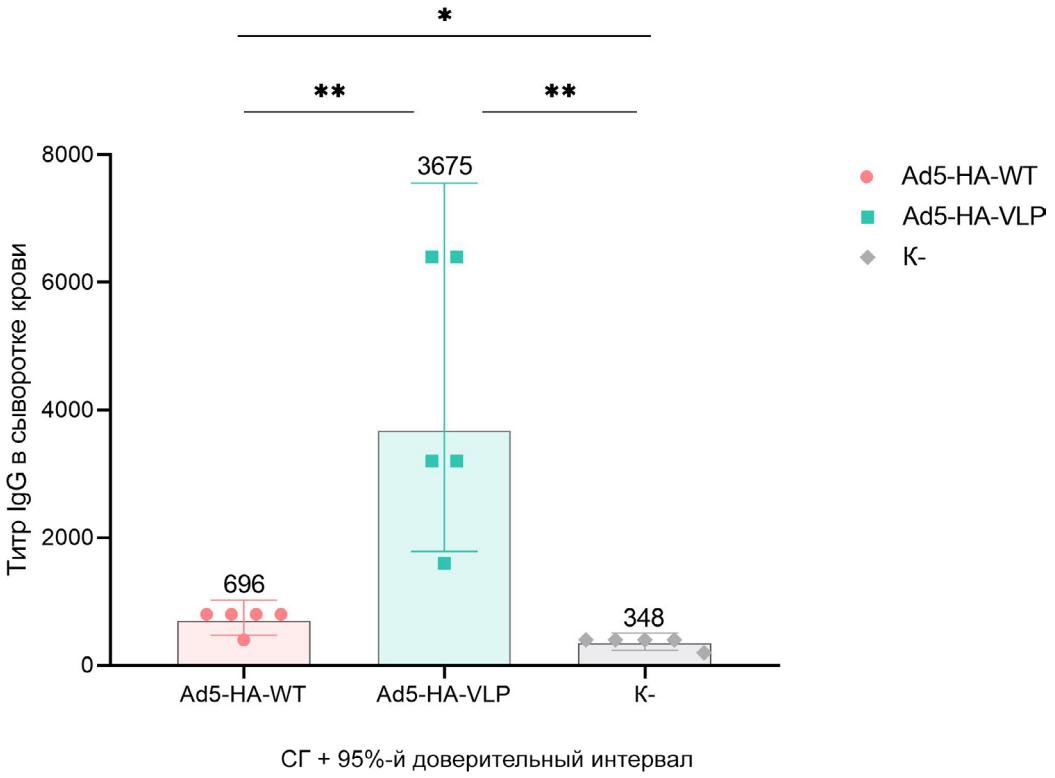


Рис. 2. Оценка титров специфических антител к HA в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами. К– — отрицательный контроль. Столбцы обозначают медиану каждой из групп (n = 5). Группы иммунизировали Ad5-HA-WT и Ad5-HA-VLP, сравнивали с помощью непараметрических U-тестов Манна — Уитни. Показано геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95%-й доверительный интервал (ДИ) для каждой из групп. Минимальный уровень значимости — $p < 0{,}05$

Согласно полученным данным, обе конструкции индуцируют выработку специфических антител, однако в группе, иммунизированной Ad5-HA-VLP, наблюдается более высокий титр антител (геометрическое среднее титра (ГСТ): 3676; 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1789–7552) в сравнении с группой, иммунизированной Ad5-HA-WT (ГСТ: 696; 95%-й ДИ 474–1023). Методом РТГА выявлено, что Ad5-HA-VLP индуцирует более высокие титры гемагглютинирующих антител (ГСТ 42; 95%-й ДИ 16– 113) в сравнении с Ad5-HA-WT (ГСТ 16; 95%-й ДИ 6–46) ($p < 0,05$).

Таким образом, добавление к НА вируса гриппа типа В последовательностей, способствующих образованию самоорганизующихся VLP, достоверно увеличивает иммуногенность антигена в составе аденовирусного вектора при интраназальной иммунизации в сравнении с рекомбинантным аденовирусом, несущим дикий тип НА. Далее в работе планируется изучение влияния полученных конструкций на протективность аденовирусных векторов, а также изучение клеточного иммунного ответа.

Литература

1. Gaitonde D., Moore F., Morgan M. Influenza: Diagnosis and Treatment // Am. Fam. Physician. 2019. Vol. 100 (12). P. 751–758.

2. Hoffmann M., Yang Z., Huey-Tubman K. et al. ESCRT recruitment to SARS-CoV-2 spike induces virus-like particles that improve mRNA vaccines // Cell. 2023. Vol. 186 (11). P. 2380–2391.

3. Young L., Dong Q. Two-step total gene synthesis method // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32 (7). P. 59–65.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-111

СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПОКРЫТЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ И ЗАГРУЖЕННЫХ ДОКСОРУБИЦИНОМ *

SYNTHESIS OF MAGNETIC NANOPARTICLES COATED WITH HUMAN SERUM ALBUMIN AND LOADED BY DOXORUBICIN

К. Д. Петров, Е. В. Дмитриенко, А. С. Чубаров

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

K. D. Petrov, E. V. Dmitrienko, A. S. Chubarov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ k.petrov@g.nsu.ru

Аннотация

Магнитные наночастицы оксида железа (II, III) (MNP) вызывают значительный интерес для биомедицинских приложений, таких как средства диагностики и терапии на их основе. Однако их применение ограничено склонностью MNP к окислению и агрегации. Покрытие человеческим сывороточным альбумином (HSA) позволяет повысить их стабильность и биосовместимость, а также обеспечить таргетную доставку в опухолевую ткань.

Abstract

Magnetite nanoparticles attract significant interest for biomedical applications, including diagnostic and therapeutic approaches. However, their utility is limited by susceptibility to oxidation and aggregation. Coating with human serum albumin, the predominant blood plasma protein, improves their stability and enhances biocompatibility, while enabling targeted delivery to tumor tissue.

Магнитные наночастицы оксида железа (II, III) представляют собой ценный инструмент для биологии, биохимии, диагностики и медицины [1]. Они относительно просты в получении, экономичны и в большинстве случаев биосовместимы благодаря участию ионов железа в метаболизме [2]. Однако применение MNP ограничено их высокой поверхностной энергией, что приводит к агрегации и окислению, вызывая потерю магнитных свойств и увеличение токсичности *in vivo* [3]. Другой значительной проблемой является их быстрая элиминация из кровотока, обусловленная действием врожденной иммунной системы [4, 5]. Вызванное этим неспецифическое накопление в различных органах приводит к тому, что менее 1 % введенных MNP достигает опухолевого очага [6].

В данной работе представлен синтез MNP, стабилизированных олеиновой кислотой (OA) и Tween 20 (TW20), и исследовано их взаимодействие с HSA. Емкость загрузки альбумином составила до 1,75 и 1,43 мг/мг для MNP_OA_HSA и MNP_OA_TW20_HSA соответственно. Изучено влияние покрытия HSA на размер частиц, ζ-потенциал, склонность к агрегации и их токсичность. Характеризация частиц проводилась методами динамического светорассеяния, просвечивающей электронной микроскопии и ИК-спектроскопии. Для оценки эффективности применения в МРТ были определены релаксивности наночастиц (r_1 и r_2) в магнитном поле 1,88 Тл.

Определено, что максимальная емкость загрузки противоопухолевого препарата доксорубицина (DOX) в MNP с альбуминовым покрытием составляет 725 мкг/мг, при этом наночастицы MNP-DOX демонстрировали pH-зависимое высвобождение препарата. Продемонстрировано ингибирование клеточной линии A549 серией нанокомпозитов, нагруженных DOX, и оценены значения IC_{50}. Предполагается, что альбуминовое покрытие и загрузка лекарственным средством создают основу для разработки интеллектуальных тераностических конструкций направленной доставки для осуществления внутривенной терапии онкологических заболеваний.

Литература

1. Schneider M. G. M., Martín M. J. et al. Biomedical applications of iron oxide nanoparticles: current insights, progress and perspectives // Pharmaceutics. 2022. Vol. 14, No. 204. P. 25.

2. Wallace D. F. The regulation of iron absorption and homeostasis // Clinical Biochemistry Review. 2016. Vol. 37, No. 2. P. 51–62.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 125012300656-5.

© К. Д. Петров, Е. В. Дмитриенко, А. С. Чубаров, 2025

3. Schwaminger S. P., Bauer D. et al. Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties // CrystEngComm. 2017. Vol. 19, No. 2. P. 246–255.

4. Sadrieh N., Dobrovolskaia M. A. Minireview: nanoparticles and the immune system // Endocrinology. 2010. Vol. 151, No. 2. P. 458–465.

5. Yu Z., Li Q. et al. Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field // Nanoscale Research Letters. 2020. Vol. 15, No. 115. P. 14.

6. Wilhelm S., Tavares A. J. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // Nature Reviews Materials. 2016. Vol. 1. P. 1–12.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-112

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ CO_2-ЭКСТРАКТОВ ИЗ РАСТЕНИЯ РОДА *AMARANTHUS*

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CO_2 EXTRACTS OF PLANTS OF THE GENUS *AMARANTHUS*

А. А. Петрова

Кемеровский государственный университет

A. A. Petrova

Kemerovo State University

✉ annapet1120@mail.ru

Аннотация

Экстракты растительного происхождения могут выступать в качестве альтернативных антибактериальных средств. Данная работа посвящена изучению антимикробной активности CO_2-экстрактов амаранта диско-диффузионным методом. Выявленная антимикробная активность подтверждает перспективность использования амаранта в фармацевтической и других отраслях.

Abstract

Extracts of plant origin can act as alternative antibacterial agents. This work is devoted to the study of the antimicrobial activity of CO_2 extracts of amaranth using the disk diffusion method. The identified antimicrobial activity confirms the prospects of using amaranth in pharmaceutical and other industries.

Антимикробная активность — это способность вещества или экстракта подавлять рост (бактериостатическое или фунгистатическое действие) или полностью уничтожать (бактерицидное или фунгицидное действие) различные микроорганизмы, включая бактерии, грибы и вирусы. У растений за антимикробную активность отвечают вторичные метаболиты. Биоактивные компоненты растений доказали свой потенциал не только как прямые антибактериальные средства, но и как усилители, способные повышать эффективность других антибиотиков. Исследования, посвященные использованию фитохимических веществ и растительных экстрактов для преодоления микробной резистентности, приобретают все большую актуальность. Ценность фитосоединений заключается в их способности воздействовать на бактерии по иным, чем традиционные антибиотики, механизмам [1]. Это открывает новые перспективы в борьбе с устойчивыми патогенами.

Определение антимикробной активности является актуальным направлением в исследованиях, так как происходит рост числа штаммов микроорганизмов, таких как грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*), грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae*) и дрожжевые грибы (*Candida albicans*), устойчивых к антибиотикам и которые вызывают множество инфекционных заболеваний. Экстракты растительного происхождения могут выступать в качестве альтернативных антибактериальных средств.

Натуральные продукты на растительной основе должны представлять наибольший интерес для современной фармацевтической промышленности, поскольку являются основным источником новых химических соединений, направленных на новые лекарственные мишени.

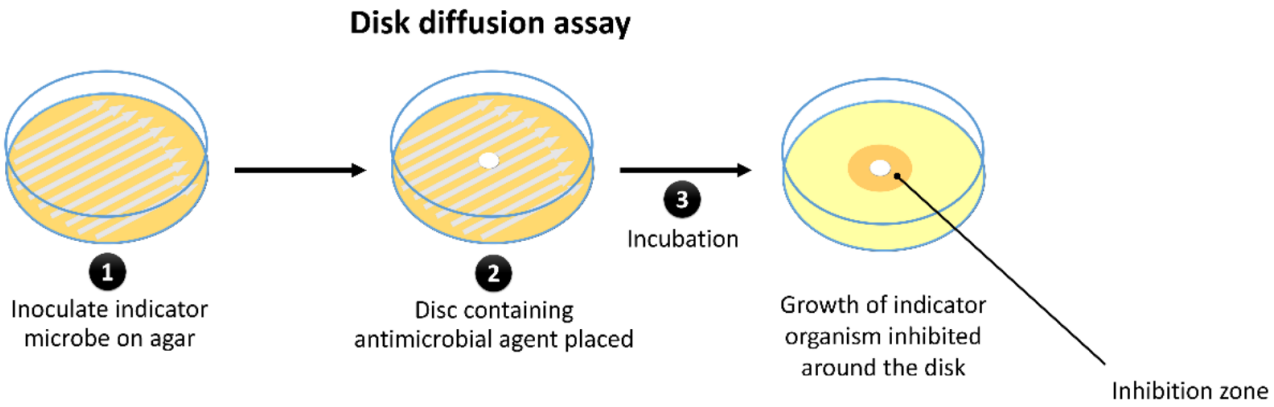
Среди множества растений, обладающих потенциальными антимикробными свойствами, особое внимание привлекает амарант (*Amaranthus spp*.). Известный своей высокой пищевой ценностью и богатым химическим составом, амарант широко культивируется и используется в различных отраслях.

Зерно амаранта является источником разнообразных биологически активных веществ. Фитостеролы и флавоноиды в его составе способствуют клеточной регенерации и поддерживают работу сердца. Важно отметить также наличие в амаранте сквалена, токоферолов и пептидов, которые обеспечивают его мощные антиоксидантные, противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства, относящиеся и к его экстрактам [2].

Существуют различные способы определения антимикробной активности, такие как метод диффузии в агар, метод разведений, Е-тест, тонкослойная хроматография (ТСХ) с биоавтографией, тест time-kill и др.

© А. А. Петрова, 2025

Нами были получены CO_2-экстракты из семян амаранта методом сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ-CO_2). Это позволило получить высокочистые экстракты без использования органических растворителей. Полученные экстракты были проанализированы на антимикробную активность диско-диффузионным методом (см. рисунок). Диско-диффузионный способ определения антимикробной активности (метод Кирби — Бауэра) удобен простотой исполнения и возможностью тестирования большого количества антимикробных агентов на различных микроорганизмах.



Диско-диффузионный метод определения антимикробной активности

Метод основан на ингибировании антибиотиком или иным препаратом поверхностного роста микроорганизмов на плотной питательной среде. Градиент концентрации антибиотика в среде создается в результате его диффузии из носителя. Вокруг каждого диска образуется зона ингибирования — область, в которой рост микроорганизмов подавляется. Размер этой зоны служит индикатором чувствительности микроорганизмов к данному противомикробному препарату [3].

Исследуемые образцы масла семян амаранта показали высокую антимикробную активность по отношению к штаммам бактерий рода *Pseudomonas*.

Обнаруженная антимикробная активность позволит оценить потенциал применения исследуемых соединений как в чистом виде, так и в составе композиций в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности для создания безопасных и эффективных продуктов.

Литература

1. Salishcheva O. V., Prosekov A. Yu. Antimicrobial activity of mono- and polynuclear platinum and palladium complexes // Foods and Raw Materials. 2020. Vol. 8, No. 2. P. 298–311.

2. Петрова А. А., Салищева О. В., Марков А. С. Влияние параметров сверхкритической CO_2-экстракции семян растения рода Amaranthus на выход целевых компонентов // Молочная промышленность. 2025. № 1. С. 55–63.

3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар. XIV изд. URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.Html (дата обращения: 29.06.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-113

НОВАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ, ПОЛИСАХАРИДНАЯ КОНЪЮГИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ СЕРОГРУПП A, B, C, W И Y

A NOVEL RECOMBINANT, POLYSACCHARIDE CONJUGATED VACCINE AGAINST MENINGOCOCCAL INFECTION CAUSED BY SEROGROUPS A, B, C, W, AND Y

Ю. В. Плетюхина, Н. С. Савельев, А. А. Белянкин, Э. А. Рузанова, Д. Н. Поляков, А. А. Ячменева, А. П. Савельева, Ф. С. Колмогоров, И. И. Тедеев, А. И. Крылова, В. В. Клыков, М. С. Анферова, С. О. Рабдано

Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток

I. V. Pletiukhina, N. S. Savelev, A. A. Belyankin, E. A. Ruzanova, D. N. Polyakov, A. A. Yachmeneva, A. P. Saveleva, F. S. Kolmogorov, I. I. Tedeev, A. I. Krylova, V. V. Klykov, M. S. Anferova, S. O. Rabdano

Saint Petersburg Scientific and Research Institute of Vaccines and Serums

✉ y.v.pletuhina@niivs.ru

Аннотация

Разработана отечественная рекомбинантная пятивалентная вакцина против менингококка серогрупп A, B, C, W и Y, включающая белки fHbp-подсемейств A и B и конъюгированные полисахариды. Доклинические исследования показали высокую иммуногенность, бактерицидную активность и безопасность. Вакцина прошла I фазу клинических испытаний.

Abstract

A domestic recombinant pentavalent vaccine against meningococcal serogroups A, B, C, W, and Y was developed, containing protein fHbp subfamilies A and B and conjugated polysaccharides. Preclinical studies demonstrated high immunogenicity, bactericidal activity and safety. The vaccine has passed Phase I clinical trials.

Введение

Менингококковая инфекция, вызываемая бактерией *Neisseria meningitidis*, остается актуальной проблемой здравоохранения в связи с тяжелым течением и высокой летальностью. Серогруппы A, B, C, W и Y являются основными возбудителями инвазивной менингококковой болезни (ИМБ) [1]. В последние десятилетия в мировой практике успешно применяются полисахаридные конъюгированные вакцины против серогрупп A, C, W и Y [1, 2], однако для серогруппы B, капсульный полисахарид которой обладает низкой иммуногенностью, были разработаны отдельные белковые вакцины [3, 4]. В Российской Федерации ранее не было зарегистрировано препаратов, обеспечивающих защиту одновременно от всех пяти серогрупп. В связи с этим была разработана новая отечественная пятивалентная вакцина, включающая антигены серогрупп A, B, C, W и Y, сочетающая рекомбинантные белки fHbp (factor H binding protein) и полисахаридные компоненты. Подобные комбинированные вакцины начали применяться за рубежом только в 2023–2024 гг. [1].

Материалы и методы

Разработанный препарат включает два рекомбинантных белка fHbp из различных антигенных подсемейств A и B, каждый из которых представляет вариант белка, способный индуцировать перекрестный иммунитет [3]. Также рекомбинантный белок fHbp смешанного подсемейства AB используется как белковый носитель для конъюгации с капсульными полисахаридами серогрупп A, C, W и Y, исключая введение постороннего белка-носителя. Конъюгированные полисахариды в составе вакцины обеспечивают Т-зависимый иммунный ответ с формированием иммунологической памяти [2]. Полный цикл производства вакцины, включая экспрессию белков, очистку компонентов и финальную формулировку, осуществляется в Российской Федерации.

В рамках доклинических исследований были определены уровень гуморального ответа методом ИФА и функциональной активности антител в реакции серозависимой бактерицидной активности (SBA) на животных моделях кроликов. В качестве контрольных групп использовали животных, получивших плацебо. Токсикологические исследования проводились по стандартным регламентам для оценки безопасности.

© Ю. В. Плетюхина, Н. С. Савельев, А. А. Белянкин, Э. А. Рузанова, Д. Н. Поляков, А. А. Ячменева, А. П. Савельева, Ф. С. Колмогоров, И. И. Тедеев, А. И. Крылова, В. В. Клыков, М. С. Анферова, С. О. Рабдано, 2025

Обсуждение

Результаты ИФА показали выраженный гуморальный иммунный ответ к каждому из компонентов вакцины. Уровни специфических IgG-антител к белкам fHbp и полисахаридам A, C, Y, W многократно превышали значения в контрольной группе. SBA-анализ подтвердил наличие бактерицидной активности против менингококков всех пяти серогрупп. Особенно важно, что титры бактерицидных антител против серогруппы B, индуцированные компонентами fHbp, были сопоставимы с зарубежными аналогами [4].

Выбор двух вариантов fHbp из подсемейств A и B обусловлен их иммунологической разнородностью; подобная стратегия обеспечивает широкий охват циркулирующих штаммов [3, 5]. Кроме того, использование белков fHbp в качестве носителей повышает специфичность и силу иммунного ответа на конъюгированные полисахариды [2]. Отечественный препарат выгодно отличается от существующих аналогов отсутствием постороннего белкового носителя, наличием полной локализации производства и сочетанием антигенов всех значимых серогрупп в одной дозе. Зарубежная вакцина MenABCWY одобрена в 2023 г., данных по ее применению пока мало [1].

Заключение

Новая отечественная рекомбинантная вакцина против менингококковой инфекции демонстрирует высокую иммуногенность и бактерицидную активность в доклинических исследованиях. Благодаря включению антигенов серогрупп A, B, C, W и Y и полной локализации производства, препарат имеет потенциал стать основой широкого охвата вакцинации против менингококковой инфекции в России. В 2025 г. начата первая фаза клинических исследований.

Литература

1. Marshall G. S., Fergie J. E., Presa J., Peyrani P. Rationale for the Development of a Pentavalent Meningococcal Vaccine: A US-Focused Review // Infectious Diseases and Therapy. 2022. Vol. 11, No. 3. P. 937–951.

2. Bröker M., Berti F., Costantino P. Factors contributing to the immunogenicity of meningococcal conjugate vaccines // Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2016. Vol. 12, No. 7. P. 1808–1824.

3. Yee W. X., Barnes G., Lavender H., Tang C. M. Meningococcal factor H-binding protein: implications for disease susceptibility, virulence, and vaccines // Trends in Microbiology. 2023. Vol. 31, No. 8. P. 805–815.

4. Костюкова Н. Н., Бехало В. А. Менингококковые вакцины новых поколений — первые 20 лет применения // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 4. С. 103–113.

5. Королева И. С., Королева М. А. Мировой опыт применения менингококковых вакцин серогруппы В (обзор литературы) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 6. С. 100–107.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-114

ГЕНЕРАЦИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ КАПЕЛЬ ОТРИЦАТЕЛЬНЫМ ДАВЛЕНИЕМ ДЛЯ СИНТЕЗА АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОГЕЛЕЙ С КЛЕТКАМИ *

NEGATIVE PRESSURE GENERATION OF MICROFLUIDIC DROPLETS FOR FORMATION OF CELL-LADEN ALGINATE MICROGELS

П. С. Плешаков[1], Н. А. Филатов[1], С. В. Шмаков[1], А. С. Букатин[1,2]

[1]*Санкт-Петербургский Академический университет им. Ж. И. Алфёрова РАН*
[2]*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*

P. S. Pleshakov[1], N. A. Filatov[1], S. V. Shmakov[1], A. S. Bukatin[1,2]

[1]*Alferov Saint Petersburg National Research Academic University RAS*
[2]*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg*

✉ avekipp@gmail.com

Аннотация

Разработана простая и надежная микрофлюидная система для получения альгинатных микрогелей со сложной структурой и живыми клетками под действием отрицательного давления. Метод обеспечивает высокую воспроизводимость, контроль размера (80–120 мкм) и жизнеспособность клеток более 80 %, что перспективно для использования в регенеративной медицине и модели 3D клеточной культуры для тестирования лекарств.

Abstract

A simple and reliable microfluidic system has been developed for producing alginate microgels with a complex structure and living cells under negative pressure. The method provides high reproducibility, size control (80–120 μm) and cell viability of more than 80 %, which is promising for use in regenerative medicine and 3D cell culture models for drug testing.

3D-культуры клеток, включая клеточные сфероиды и органоиды, являются отличным инструментом в современных биомедицинских исследованиях благодаря их способности более точно имитировать условия *in vivo* [1–3]. Гидрогели являются наиболее часто используемыми материалами для создания 3D-культур клеток, искусственных тканей и органоидов. Благодаря сходству с нативным внеклеточным матриксом, клетки, загруженные в гидрогель, пролиферируют с его замещением собственным внеклеточным матриксом [4]. Одним из недостатков объемных гидрогелевых структур является ограничение диффузии питательных веществ и кислорода к клеткам и отсутствие удаления токсичных продуктов метаболизма [5]. Для преодоления предела диффузии в последнее десятилетие все больше внимания уделяется гидрогелевым микрочастицам (микрогелям), размер которых обычно не превышает 300 мкм. Такие микрогели воспроизводят внеклеточную среду так же хорошо, как и стандартные гидрогели, при этом скорость диффузии достаточна для длительного культивирования клеток благодаря максимальному пределу диффузии кислорода 200 мкм [6]. Поэтому микрогели находят многочисленные применения в фундаментальных исследованиях клеток в трехмерной среде [7], а также в регенеративной медицине для доставки лекарств и клеточной терапии поврежденных и больных тканей [8, 9].

В настоящее время существует довольно много методов получения микрогелей. Среди них одним из наиболее перспективных методов получения микрогелей является эмульгирование водных растворов прекурсоров гидрогелей в несмешивающемся масле в генераторе микрофлюидных капель [10]. После генерации раствор гидрогеля сшивается внутри капель «вода-в-масле», превращая их в сферические гидрогелевые микрочастицы.

Главным преимуществом такого подхода является идеальный контроль размера и структуры микрогелей в диапазоне от 30 до 300 мкм с относительно низким распределением по размерам и высокой производительностью.

Однако для стабильного получения микрогелей со сложной внутренней структурой и живыми клетками требуется точная регулировка всех потоков жидкости и поддержание их постоянной скорости на протяжении всего процесса. Поэтому установка, обычно основанная на прецизионных шприцевых насосах или регулято-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10117).
© П. С. Плешаков, Н. А. Филатов, С. В. Шмаков, А. С. Букатин, 2025

рах давления, становится громоздкой и дорогой, требуя высококвалифицированного специалиста в области микрофлюидики [11]. Это является серьезным препятствием для расширения области применения микрогелей для создания трехмерных клеточных культур, тканевой инженерии и биопечати в исследовательских и клинических целях.

В данном исследовании был использован трехэтапный экспериментальный подход для разработки генераторов капель с фокусировкой микрофлюидного потока, в которых жидкости вводятся под действием отрицательного давления в выходной резервуар для получения микрогелей со структурой «ядро — оболочка» и «янус» с живыми клетками. Такие микрофлюидные чипы требуют простой экспериментальной установки, просты в эксплуатации, надежны и дают воспроизводимые результаты. Это происходит потому, что размер и структура генерируемых частиц определяются конструкцией микроканалов, в то время как единственный управляющий параметр — давление в выходном резервуаре — задает частоту генерации микрогелей. Чтобы продемонстрировать широкий спектр применения нашего подхода, были получены альгинатные микрогели со структурой «ядро — оболочка» и «янус» размером от 80 до 120 мкм с инкапсулированными клетками аденокарциномы толстого кишечника мыши CT26 и гепатомы печени HepG2 со скоростью генерации до 200 мкл/ч и жизнеспособностью клеток более 80 % в течение 12–15 дней культивирования. Эти результаты открывают новые перспективы для автоматизации и масштабирования синтеза гидрогелевых микрогелей для применения в тканевой инженерии и 3D-биопечати.

Литература

1. Pampaloni F., Reynaud E. G., Stelzer E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2007. Vol. 8, No. 10. P. 839–845.

2. Zhao Z. et al. Organoids // Nature Reviews Methods Primers. 2022. Vol. 2, No. 1. P. 94.

3. Kim J., Koo B. K., Knoblich J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine // Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol. 21, No. 10. P. 571–584.

4. Geckil H. et al. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics // Nanomedicine. 2010. Vol. 5, No. 3. P. 469–484.

5. Drury J. L., Mooney D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications // Biomaterials. 2003. Vol. 24, No. 24. P. 4337–4351.

6. Jiang W. et al. Cell-laden microfluidic microgels for tissue regeneration // Lab on a Chip. 2016. Vol. 16, No. 23. P. 4482–4506.

7. Caldwell A. S., Aguado B. A., Anseth K. S. Designing microgels for cell culture and controlled assembly of tissue microenvironments // Advanced Functional Materials. 2020. Vol. 30, No. 37. P. 1907670.

8. An C. et al. Continuous microfluidic encapsulation of single mesenchymal stem cells using alginate microgels as injectable fillers for bone regeneration // Acta Biomaterialia. 2020. Vol. 111. P. 181–196.

9. Headen D. M., García J. R., García A. J. Parallel droplet microfluidics for high throughput cell encapsulation and synthetic microgel generation // Microsystems & Nanoengineering. 2018. Vol. 4, No. 1. P. 1–9.

10. Tumarkin E., Kumacheva E. Microfluidic generation of microgels from synthetic and natural polymers // Chemical Society Reviews. 2009. Vol. 38, No. 8. P. 2161–2168.

11. Zeng W., Li S., Wang Z. Characterization of syringe-pump-driven versus pressure-driven microfluidic flows // 2015 International Conference on Fluid Power and Mechatronics (FPM). IEEE, 2015. P. 711–715.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-115

РАЗРАБОТКА И МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА

DEVELOPMENT AND SCALING OF CELL LINE CULTIVATION TECHNOLOGY PRODUCING MODIFIED SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES

Д. С. Полянский[1,2], Е. И. Рябова[1,3], А. А. Деркаев[1], В. В. Прокофьев[1], М. А. Довгий[1], Д. В. Щебляков[1], А. П. Карпов[1], И. Б. Есмагамбетов[1]

[1]Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва
[2]Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[3]Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина, Москва

D. S. Polyansky[1,2], E. I. Ryabova[1,3], A. A. Derkaev[1], V. V. Prokofiev[1], M. A. Dovgiy[1], D. V. Shcheblyakov[1], A. P. Karpov[1], I. B. Esmagambetov[1]

[1]N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow
[2]Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA — Russian Technological University, Moscow
[3]Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — K. I. Skryabin MVA, Moscow

✉ preclanc@mail.ru

Аннотация

Существует множество работ, демонстрирующих успешное применение модифицированных однодоменных антител для терапии и профилактики различных инфекционных заболеваний [1–7]. Мы показали возможность разработки и масштабирования технологии культивирования эукариотических продуцентов для получения препаратов на основе модифицированных однодоменных антител с вируснейтрализующей активностью против различных штаммов вируса SARS-CoV-2.

Abstract

There are many works demonstrating the successful application of modified single-domain antibodies for the therapy and prevention of various infectious diseases [1–7]. We have shown the possibility of developing and scaling up the technology of eukaryotic producers for obtaining drugs based on modified single-domain antibodies with virus-neutralizing activity against various strains of the SARS-CoV-2 virus.

Введение

В ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России получено модифицированное однодоменное антитело P2C5-Fc, обладающее вируснейтрализующей активностью в отношении различных штаммов вируса SARS-CoV-2: B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.1.28/P.1 (Gamma) и B.1.1.529 (Omicron) [1], а также модифицированное однодоменное антитело B10-Fc, обладающее широким спектром вируснейтрализующей активности в отношении штаммов Wuhan D614G, Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron BA.1, BA.2, BA.5 и более поздних вариантов — XBB.1, XBB.1.5, XBB.1.9, XBB.1.16, JN.1 и KS.1. вируса SARS-CoV-2 [8]. Далее были получены эукариотические продуценты антител P2C5-Fc (CHO-GamP2C5) и B10-Fc (CHO-GamB10) на основе клеток CHO и разработана технология их культивирования [9]. Цель данной работы — масштабирование технологии культивирования клеточных линий-продуцентов антител CHO-GamP2C5 и CHO-GamB10 на GMP-производстве.

Результаты

Для клона CHO-GamP2C5 оптимальные параметры процесса культивирования были достигнуты в биореакторе с осевым типом перемешивания при pH 7.2 с использованием понижения температуры с 37 до 33 °C начиная с достижения культуры клеток максимальной плотности и до конца культивирования, на питательной среды ActiPro™ в комбинации с питательными добавками 7A и 7B. Данная среда была лучшей из данного перечня: ActiPro™ (Cytiva, США), Fujifilm BalanCD® CHO Growth A (Irvine Scientific, США), Cosmos (Flora Bio, Турция), SFM4CHO (Cytiva, США), Dynamis™ AGT™ (Thermo Fisher Scientific, США), Capricorn (Capricorn Scientific,

© Д. С. Полянский, Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, В. В. Прокофьев, М. А. Довгий, Д. В. Щебляков, А. П. Карпов, И. Б. Есмагамбетов, 2025

Германия) после ряда экспериментов [9]. Для перехода в биореактор производственного масштаба (биореактор с осевым типом перемешивания) была использована система минибиореакторов Ambr® 250, с помощью которой подобраны оптимальные параметры по температуре и pH. Кроме того, в исследовании было выяснено, что показатели продуктивности для клеточной линии CHO-GamP2C5 в биореакторе с волновым и осевым типом перемешивания имеют разные значения. Для данного клона в биореакторе с волновым типом перемешивания наилучший результат по выходу целевого антитела был продемонстрирован при T = 37 °C и составил 440 мкг/мл, а при культивировании в биореакторе с осевым типом перемешивания (минибиореактор Ambr® 250) наибольшая продуктивность была продемонстрирована при T = 33 °C и составила 456 мкг/мл. После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной линии CHO-GamP2C5 было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л, выход целевого белка 564,4 мкг/мл.

Для культивирования клона CHO-GamB10 использовались китайские аналоги питательных сред и подпиток OptiVitro (ExCelbio, Китай), OptiVitro CE02 (ExCelbio, Китай), OptiVitro CE01 (ExCelbio, Китай), Eden B S601S (BioEngine, Китай), EmCD101 (Eminence, Китай), EmCD121(Eminence, Китай), По итогам ряда экспериментов, исходя из графиков плотности, жизнеспособности клеточной суспензии на различных питательных средах и из конечного содержания целевого белка, наиболее перспективной из экспериментальных является питательная среда EmCD CHO 101 в комбинации с питательными добавками EmCD CHO Feed A 101 — 5 %, EmCD CHO Feed B 101 — 0,5 % (внесение через день). Также производилось изучение влияния масштабирования с колб до биореактора с волновым типом перемешивания и влияние понижения температуры культивирования на выход целевого белка. Для данного клона в биореакторе с волновым типом перемешивания наилучший результат по выходу целевого антитела был 400 мкг/мл, а при культивировании в биореакторе с осевым типом перемешивания (минибиореактор Ambr® 250) наибольшая продуктивность была 490 мкг/мл. Данный клон продемонстрировал наиболее высокое значение продуктивности при T = 37 °C вне зависимости от типа перемешивания в биореакторе. После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной линии CHO-GamB10 было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 50 л, выход целевого белка практически не изменился и составил 495 мкг/мл.

Таким образом, в нашей работе была разработана эффективная технология культивирования клеток CHO, стабильно продуцирующих однодоменные антитела, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, для экстренной профилактики и терапии инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Литература

1. Favorskaya I. A., Shcheblyakov D. V., Esmagambetov I. B. et al. Single-domain antibodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern // Front. Immunol. 2022. No. 13.

2. Есмагамбетов И. Б., Щебляков Д. В., Егорова Д. А. и др. Наноантитела — потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола // Acta Naturae. 2021. No. 13 (4). С. 53–63.

3. Derkaev A. A., Ryabova E. I., Esmagambetov I. B. et al. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis // Front. Microbiol. 2022. No. 13.

4. Voronina D. V., Shcheblyakov D. V., Favorskaya I. A. et al. Cross-reactive Fc-fused single-domain antibodies to hemagglutinin stem region protect mice from group 1 influenza A virus infection // Viruses. 2022. No. 14 (11).

5. Panova E. A., Kleymenov D. A., Shcheblyakov D. V. et al. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A // Front. Immunol. 2023. No. 14.

6. Godakova S. A., Noskov A. N., Vinogradova I. D. et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice // Toxins (Basel). 2019. No. 11 (8).

7. Esmagambetov I. B., Ryabova E. I., Derkaev A. A. et al. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 // Front. Immunol. 2023. No. 14.

8. Shcheblyakov D. V., Favorskaya I. A., Dolzhikova I. V. et al. Ultra-potent RBM-specific single-domain antibody broadly neutralizes multiple SARS-CoV-2 variants with picomolar activity // Int. J. Biol. Macromol. 2025. No. 19.

9. Полянский Д. С., Рябова Е. И., Деркаев А. А. и др. Разработка технологии культивирования клеточной линии, продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека // Тонкие химические технологии. 2024. № 19 (3). С. 240–257.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-116

РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОЙ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ VEGF165/ANG-1 И ОЦЕНКА ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ ИШЕМИЗИРОВАННЫХ КОНЕЧНОСТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO* *

DEVELOPMENT OF A COMBINED PLASMID CONSTRUCT ENCODING VEGF165 AND ANG-1 AND EVALUATION OF ITS EFFECT ON THE RESTORATION OF ISCHEMIC LIMB FUNCTION *IN VIVO*

Е. А. Попичева[1], А. Б. Саченко[1], В. В. Щур[1], В. Г. Богдан[2], А. С. Доронькина[3], С. В. Маньковская[3], А. В. Янцевич[1]

[1]*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск*
[2]*Национальная академия наук Беларуси, Минск*
[3]*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск*

E. A. Popicheva[1], A. B. Sachanka[1], V. V. Shchur[1], V. G. Bogdan[2], A. S. Doronkina[3], S. V. Mankovskaya[3], A. V. Yantsevich[1]

[1]*Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk*
[2]*National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*
[3]*Institute of Physiology NAS of Belarus, Minsk*

✉ ekaterinapopicheva@mail.ru

Аннотация

Исследование посвящено разработке комбинированной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 для лечения хронической ишемии нижних конечностей. Введение плазмиды крысам с моделированной ишемией конечностей показало значительное улучшение кровоснабжения и снижение болевых реакций.

Abstract

The study focuses on the development of a combined plasmid construct pcDNA_VEGF165/Ang-1, for the treatment of chronic limb ischemia. Injection of this plasmid into rats with limb ischemia resulted in significant improvements in tissue perfusion and reductions in pain responses.

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является одной из самых распространенных и социально значимых патологий сердечно-сосудистой системы человека. Перспективным методом лечения ХИНК является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ишемизированные ткани генетических конструкций (ДНК-плазмид) с генами факторов роста [1]. ДНК-плазмиды, кодирующие гены фактора роста эндотелия сосудов (особенно изоформу VEGF165) и ангиопоэтина-1 (Ang-1), продемонстрировали свою эффективность в лечении ХИНК [2]. Мы предполагаем, что объединение этих двух генов в одной плазмидной конструкции усилит восстановление кровоснабжения и вызовет более выраженный ангиогенез.

Оптимизированные гены для экспрессии белков Ang-1_VEGF165 в клетках человека синтезировали *de novo*, используя полимеразную цепную сборку. Синтетические гены лигировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.1(−) по сайтам рестрикции NheI и HindIII. Плазмиды с генами трансформировали в клетки *E. coli* штамма DH5α и культивировали в ТБ-среде. Полученные клетки подвергали щелочному лизису с последующим удалением клеточного дебриса фильтрацией и концентрированием ультрафильтрацией. Сконцентрированный ретентант обрабатывали детергентом для удаления эндотоксина. Стерилизацию препарата проводили фильтрацией через 0,2 нм полиэфирсульфоновый (PES) фильтр.

Оценку восстановления функций ишемизированных задних конечностей *in vivo* проводили на крысах Wistar (n = 40) обоих полов, возрастом 8 месяцев. Введение исследуемой субстанции и апирогенного физиологического раствора (АФР) осуществляли внутримышечно в дозе 100 мкг/кг на 28-е сутки после моделирования ХИНК. Прогрессирование ХИНК оценивали по порогу ноцицептивной реакции (ПНР; тест Рандалла — Селитто) и изменению паттерна походки.

* Исследование выполнено при поддержке НАН Беларуси, рег. № НИОКТР 20230178.

© Е. А. Попичева, А. Б. Саченко, В. В. Щур, В. Г. Богдан, А. С. Доронькина, С. В. Маньковская, А. В. Янцевич, 2025

В результате культивирования было собрано 115 г клеточной массы, из которой выделено 50 мг плазмидной ДНК. После завершения всех этапов очистки плазмидной ДНК ее содержание в суперскрученной форме составило более 85 %, уровень эндотоксина — менее 5 ЕЭ на 1 мг ДНК, а количество остаточной РНК продуцента — менее 2 %, что соответствует международным требованиям к препаратам на основе суперскрученных кольцевых ДНК.

Введение раствора pcDNA-VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/кг оказывало протекторное действие и сопровождалось выраженным антиноцицептивным эффектом с 14-х суток после инъекции. Это проявлялось достоверным повышением ПНР на 23 %, увеличением площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 50 % и его интенсивности на 24 % по сравнению с показателями до инъекции. К 28-м суткам после инъекции ПНР выросла на 34,0 % у самок и на 40,2 % у самцов, при этом площадь и интенсивность отпечатка травмированной конечности вернулись к исходным значениям.

Таким образом, комбинированная плазмидная конструкция pcDNA-VEGF165/Ang-1 продемонстрировала выраженные антиноцицептивные эффекты, проявляющиеся с 14-х суток, и восстановление функциональной активности конечности к 28-м суткам после введения, что свидетельствует о высоком потенциале препарата как перспективного лекарственного средства.

Литература

1. Pereira V. B. et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications // World J. Vac. 2014. Vol. 4. P. 50–71.

2. Lederman R. J. et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial // The Lancet. 2002. Vol. 359 (9323). P. 2053–2058.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-117

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ α-АМИЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИЗ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS MAGNIFICA* В КАЧЕСТВЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ПЕРОРАЛЬНЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ [*]

RECOMBINANT INHIBITORS OF MAMMALIAN α-AMYLASES FROM THE SEA ANEMONE *HETERACTIS MAGNIFICA* AS EFFECTIVE ORAL AGENTS FOR CONTROLLING HYPERGLYCEMIA IN DIABETES MELLITUS

Д. В. Попкова[1], О. В. Синцова[1], А. А. Климович[1], Н. А. Бороздина[2], И. А. Дьяченко[2], Д. И. Осмаков[2], С. А. Козлов[2], И. Н. Гладких[1], Е. В. Лейченко[1]

[1] *Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток*
[2] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

D. V. Popkova[1], O. V. Sintsova[1], A. A. Klimovich[1], N. A. Borozdina[2], I. A. Dyachenko[2], D. I. Osmakov[2], S. A. Kozlov[2], I. N. Gladkikh[1], E. V. Leychenko[1]

[1] *G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok*
[2] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ daria.vladipo@yandex.ru

Аннотация

Разработана биотехнология получения мощных ингибиторов α-амилаз млекопитающих, магнификамидов. Доказана стабильность их структуры, селективность действия в отношении α-амилаз, безопасность для нервной системы и внутренних органов животных, а также эффективность в *in vivo* моделях сахарного диабета 1-го и 2-го типа.

Abstract

Biotechnology has been developed to produce potent mammalian α-amylase inhibitors, magnificamides. Their stability, selectivity for α-amylases, safety for animal nervous system and internal organs, as well as their effectiveness in animal models of type 1 and 2 diabetes have been demonstrated.

Быстрое экономическое развитие, значительное изменение образа жизни людей и увеличение продолжительности жизни населения в XXI в. привели к резкому росту распространенности сахарного диабета, к 2022 г. затронувшего около 828 млн человек [1]. В настоящее время сахарный диабет занимает лидирующие позиции в рейтингах самых опасных заболеваний человека и часто является причиной инвалидизации и смерти. Таким образом, поиск эффективных и селективных соединений, оказывающих влияние на вовлеченные в метаболизм углеводов мишени и тем самым препятствующих развитию гипергликемических и инсулинорезистентных состояний, является актуальной биомедицинской задачей современности.

Выделенные из морской анемоны *Heteractis magnifica* β-дефензин-подобные ингибиторы α-амилаз млекопитающих, магнификамид и магнификамид-2, в наномолярных концентрациях ингибируют панкреатические α-амилазы свиньи и человека, что выгодно отличает их от используемых в терапевтической практике акарбозы, миглитола и воглибозы, эффективность которых на 3–5 порядков ниже [2].

Для магнификамида и магнификамида-2 нами была разработана технология их получения в лабораторных условиях. Процедура включает экспрессию слитого белка, магнификамид-тиоредоксин, в клетках *Escherichia coli* штамма SHuffle®, хроматографическое выделение гибридного белка из лизата на носителе Ni^{2+}-NTA-агароза, рефолдинг белка с добавлением окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона, гидролиз энтерокиназой и очистку целевого пептида методом ОФ ВЭЖХ. Чистота и корректность пространственной укладки полученных рекомбинантных магнификамидов была подтверждена нами методами МАЛДИ-масс-спектрометрии и 1Н-ЯМР-спектроскопии [3].

В *in vitro* экспериментах с нативными и рекомбинантными магнификамидами была продемонстрирована их устойчивость к действию низких значений pH, протеолитической деградации и длительному температурному

[*] Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20147-П).

© Д. В. Попкова, О. В. Синцова, А. А. Климович, Н. А. Бороздина, И. А. Дьяченко, Д. И. Осмаков, С. А. Козлов, И. Н. Гладких, Е. В. Лейченко, 2025

воздействию, что в совокупности с отсутствием иммуногенности и высокой биологической активностью делает данные пептиды перспективными кандидатами для создания на их основе пероральных лекарственных средств. Показано, что магнификамиды не проявляют активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов [4], характерной для представителей семейства β-дефензинов. В результате электрофизиологического тестирования установлено отсутствие влияния ингибиторов на функционирование кислоточувствительных (ASIC), потенциал-зависимых калиевых и натриевых каналов, на которые оказывают действие токсины других морских анемон, структурно схожие с магнификамидами.

Выявлено, что в *in vivo* моделях сахарного диабета 1-го и 2-го типа магнификамиды в дозах 0,005 и 0,01 мг/кг способствуют эффективному предотвращению развития постпрандиальной гипергликемии у мышей в тесте на толерантность к крахмалу, а также снижению устойчивости к инсулину в инсулинорезистентном тесте у животных с сахарным диабетом 2-го типа. Оценена безопасность применения (острая токсичность) и подтверждено отсутствие влияния магнификамидов на поведение и ориентировочно-исследовательскую деятельность, а также состояние и функционирование внутренних органов животных при внутривенном и внутрижелудочном введении здоровым мышам в дозах до 2 мг/кг.

Таким образом, β-дефензин-подобные ингибиторы α-амилаз, магнификамиды, наряду со стабильностью и эффективностью демонстрируют высокую селективность, обусловливающую отсутствие побочных эффектов со стороны всех систем органов, что выгодно отличает их от применяемых в настоящее время препаратов для контроля гипергликемии и подчеркивает высокий фармакологический потенциал данных пептидов.

Литература

1. Zhou B., Rayner A. W., Gregg E. W. et al. Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants // The Lancet. 2024. Vol. 404. P. 2077–2093.

2. Sintsova O. V., Gladkikh I. N., Chausova V. E. et al. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β-defensin α-amylase inhibitor // Journal of Proteomics. 2018. Vol. 173. P. 12–21.

3. Sintsova O. V., Popkova D. V., Kalinovskii A. P. et al. Control of postprandial hyperglycemia by oral administration of the sea anemone mucus-derived α-amylase inhibitor (magnificamide) // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023. Vol. 168. P. 115743.

4. Sintsova O. V., Gladkikh I. N., Kalinovskii A. P. et al. Magnificamide, a β-defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α-amylases // Marine Drugs. 2019. Vol. 17. P. 542–556.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-118

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА В КОРМЛЕНИИ ФОРЕЛИ *

TECHNOLOGY OF OBTAINING AND USING A PROBIOTIC PREPARATION IN FEEDING TROUT

В. А. Потешкина, И. В. Ускова, С. Р. Деркач, А. В. Решетникова

Медико-биологический институт Мурманского арктического университета

V. A. Poteshkina, I. V. Uskova, S. R. Derkach, A. V. Reshetnikova

Medical and Biological Institute, Murmansk Arctic University

✉ poteshkinava@mauniver.ru

Аннотация

Статья посвящена исследованию эффективного использования экспериментального пробиотического препарата в кормлении сеголеток радужной форели на базе инкубационного цеха Верхне-Туломской ГЭС. Выделены и идентифицированы 5 штаммов бактерий из кишечника радужной форели. Разработана технология получения жидкой и лиофилизированной форм пробиотических препаратов и определена их хранимоспособность.

Abstract

The article is devoted to the study of the effectiveness of using an experimental probiotic preparation in feeding yearlings of rainbow trout at the Verkhne-Tulomskaya hydroelectric power station. Five bacterial strains were isolated and identified from the intestines of rainbow trout. A technology for obtaining liquid and lyophilized forms of probiotic preparations was developed, and their shelf life was determined.

Учитывая важность рыбы как основного пищевого продукта, в современной концепции здорового питания, обеспечивающего продовольственную безопасность страны, проблема конструирования рыбного продукта функционального назначения в условиях высокотехнологичной индустриальной аквакультуры является весьма актуальной и своевременной. В связи с этим возникает необходимость поиска эффективных методов в технологии выращивания товарной рыбы за счет использования бактериальных препаратов в кормлении рыб, а также усовершенствования функциональных характеристик готового рыбного продукта.

В результате исследования микробиома кишечника садковой радужной форели было выделено 5 различных микробных штаммов бактерий: 2 (№ 3, 5) — из химуса, 3 (№ 1, 2, 4) — из слизистой кишечника. Методом MALDI–ToF MS было идентифицировано, что исследуемые штаммы относятся к *Micrococcus luteus* (№ 1), *Bacillus pumilus* (№ 2), *Escherichia coli* (№ 3), *Carnobacterium maltaromaticum* (№ 4), бактериям рода *Pseudomonas spp* (№ 5). Определена чувствительность выделенных штаммов к желчи, солености (NaCl), соляной кислоте (HCl), pH, температуре, а также к антибактериальным препаратам (АБП) [1].

Изучена антагонистическая активность выделенных штаммов в отношении тест-культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Salmonella spp*.) методом отсроченного антагонизма на среде Бликфельдта (НПЦ «Биокомпас-С», Россия), согласно ОФС.1.7.2.0009.15 [2].

На основании оценки устойчивости к температуре, HCl, pH, желчи, NaCl, АБП, антагонистической активности был произведен селективный отбор наиболее технологически эффективных бактерий *Bacillus pumilus* и *Carnobacterium maltaromaticum*.

Разработана технология получения жидкой формы / лиофилизата пробиотического препарата на основе *Bacillus pumilus* и *Carnobacterium maltaromaticum* и проведено тестирование на хранимоспособность (определение числа жизнеспособных клеток, контроль бактериальных культур на наличие посторонней микрофлоры, изучение морфологии клеток, определение активности кислотообразования) [3].

Разработана технология обогащения гранулированных кормов пробиотическим препаратом на основе *Bacillus pumilus*: на этапе пропитки кормов пробиотическим препаратом оптимальное время, при котором сохраняется максимальная концентрация микроорганизмов на поверхности гранул, составило 10 минут.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-16-00064).

© В. А. Потешкина, И. В. Ускова, С. Р. Деркач, А. В. Решетникова, 2025

В результате эксперимента в инкубационном цеху Верхнетуломской ГЭС было выявлено, что после приема экспериментального пробиотического препарата численность микроорганизмов в кишечнике форели увеличилась на 100 тыс. клеток, были идентифицированы бактерии *Bacillus pumilus* в составе индигенной микробиоты, что указывает на успешное закрепление пробиотических микроорганизмов на слизистой оболочке кишечника.

Литература

1. МУК 4.2.1890–04. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Минздрав России, 2004. С. 15.

2. ОФС.1.7.2.0009.15. Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. 2018. XIV изд. Т. 2.

3. МУ 2.3.2.2789-10. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. М.: Минздрав России, 2010. С. 25.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-119

РАЗРАБОТКА МИКРОПЛАНШЕТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИБИОТИКОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ВЕТЕРИНАРИИ

DEVELOPMENT OF A MICROPLATE SYSTEM FOR DETERMINING THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF ANTIBIOTICS USED IN VETERINARY MEDICINE

А. С. Пырсиков, О. Е. Иванова, Д. А. Макаров, Д. А. Блюменкранц

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва

A. S. Pyrsikov, O. E. Ivanova, D. A. Makarov, D. A. Blumenkrants

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow

✉ a.pyrsikov@vgnki.ru

Аннотация

С целью разработки микропланшетов для ветеринарного мониторинга с учетом перечней антибиотиков, рекомендованных организациями ФАО/ВОЗ, ВОЗЖ, МАКМАХ, и наличия критериев интерпретации EUCAST и CLSI, составлен список тестируемых антибиотиков, важных для медицины и применения в ветеринарии, выбраны рабочие диапазоны концентраций. В настоящее время ведется подбор условий лиофильной сушки.

Abstract

In order to develop microplates for veterinary monitoring, we have taken into account the lists of antibiotics recommended by the FAO/WHO, OCIE, MAKMAX as well as the availability of EUCAST and CLSI interpretation criteria. A list of antibiotics that are important for medical and veterinary use has been compiled, and the working concentration ranges have been selected. The selection of freeze-drying conditions is currently in progress.

В мире в целом и в нашей стране в частности наиболее часто в планы исследований антибиотикоустойчивости зоонозных бактерий, выделенных от животных и из продуктов питания животного происхождения, включают *E. coli, Salmonella enterica, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*. В программы включают представителей более 20 различных классов антибиотиков, либо применяемых одновременно и для людей, и для животных, либо строго медицинские и ветеринарные препараты [1].

В настоящее время в рутинной лабораторной практике используется три метода определения чувствительности бактерий к антибиотикам — метод микроразведений в бульоне, диско-диффузионный метод и E-test [2]. Также на рынке присутствуют коммерчески доступные тест-системы на основе метода микроразделений, позволяющие провести полную либо частичную автоматизацию проводимых исследований. В ходе многолетних исследований по ветеринарному мониторингу антибиотикорезистентности в ФГБУ «ВГНКИ» получено большое количество данных, позволивших начать разработку отечественных коммерчески доступных микропланшетов для определения устойчивости к антибиотикам зоонозных бактерий, выделенных от продуктивных животных.

На основании результатов исследований микроорганизмов, встречающихся на животноводческих предприятиях и выделенных из образцов сырья, продукции животного происхождения, с производственных объектов и объектов окружающей среды, был сформирован перечень бактерий необходимый при разработке отечественных тест-планшетов. С учетом рекомендаций международных организаций были поставлены задачи подобрать список антибиотиков, выбрать рабочие диапазоны их концентраций, разработать схемы планшетов, подобрать условия лиофильной сушки и разработать нормативную документацию по применению.

Отсутствие научной литературы по обоснованию параметров лиофильной сушки антибактериальных препаратов в микропланшетах указывает на необходимость проведения исследований по возможности применения новых различных криопротекторов (растворители, связывающие агенты) с одновременным уменьшением затрат на проведение процесса лиофилизации.

Лиофильное высушивание представляет собой процесс удаления влаги из замороженного материала путем возгонки льда, который переходит в пар, минуя жидкую фазу [3]. При применении способа лиофильной сушки

© А. С. Пырсиков, О. Е. Иванова, Д. А. Макаров, Д. А. Блюменкранц, 2025

создаются такие условия, при которых антибиотик должен претерпевать минимальные изменения. Особое внимание уделяют условиям поддержания низкой температуры, отсутствию растворителя в жидкой фазе и незначительной концентрации кислорода в окружающей газовой среде [4].

Проведен ряд экспериментов по лиофильному высушиванию антибактериальных препаратов в микропланшетах (колистин, ципрофлоксацин, тетрациклин, ампициллин), ведется подбор опытных концентраций криопротекторов. С помощью масс-спектрометрического анализа оценена стабильность концентрации опытных групп антибиотиков после лиофильной сушки.

Литература

1. Макаров Д. А., Иванова О. Е., Виноградова А. Г. Антибиотикорезистентность зоонозных и индикаторных бактерий, выделяемых от продуктивных животных: практическое руководство. Смоленск: Смол. гос. мед. ун-т, 2023. С. 80.

2. Khan Z. A., Siddiqui M. F., Park S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing // Diagnostics. 2019. Vol. 9, No. 2. P. 49.

3. Kumar D. R. et al. Formulation and Evaluation of Lyophilized Antibacterial Agent // International Journal of PharmTech Research. 2013. Vol. 5, No. 4. P. 1581–1589.

4. Аршинова О. Ю., Оборотова Н. А., Санарова Е. В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных форм. 2013. № 1 (2). С. 20–24.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-120

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HCRG21 *

OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION TECHNOLOGY FOR THE ANALGESIC PEPTIDE HCRG21

А. А. Рар[1], Е. А. Волосникова[1], Т. И. Есина[1], Я. С. Гогина[1], Н. Г. Мотовилова[1], Е. Д. Даниленко[1], В. Н. Степаненко[2], М. Н. Терешин[2], Е. В. Лейченко[3]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2]*Институт трансляционной медицины и биотехнологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова*
[3]*Передовая инженерная школа Дальневосточного федерального университета, Владивосток*

A. A. Rar[1], E. A. Volosnikova[1], T I. Esina[1], Ya. S. Gogina[1], N. G. Motovilova[1], E. D. Danilenko[1], V. N. Stepanenko[2], M. N. Tereshin[2], E. V. Leychenko[3]

[1]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2]*Institute for Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov First Moscow State Medical University*
[3]*Advanced Engineering School, Far Eastern Federal University, Vladivostok*

✉ raranas@yandex.ru

Аннотация

В работе представлены результаты оптимизации технологии получения рекомбинантного анальгетического пептида HCRG21 — высокоспецифичного блокатора TRPV1-каналов. Оптимизация процесса культивирования штамма-продуцента позволила достичь выхода биомассы 6,7–13,15 г/л с содержанием целевого белка 35–40 %. Усовершенствование схемы очистки обеспечило получение серии лиофилизированной субстанции высокой степени чистоты — более 97 %.

Abstract

The paper presents the results of optimizing the technology for producing recombinant analgesic peptide HCRG21, a highly specific blocker of TRPV1 channels. Optimization of the cultivation process of the producing strain made it possible to achieve a biomass yield of 6.7–13.15 g/l with a target protein content of 35–40 %. The improvement of the purification scheme ensured the production of a series of lyophilized substances with a high degree of purity — more than 97 %.

Хроническая боль представляет собой серьезную медико-социальную проблему, затрагивающую до 40 % взрослого населения развитых стран. Существующие анальгетики, такие как опиоиды и нестероидные противовоспалительные средства, обладают ограниченной эффективностью и значительными побочными эффектами, что делает разработку новых препаратов крайне актуальной. Одной из перспективных мишеней для создания современных анальгетиков являются TRPV1-каналы, играющие ключевую роль в передаче болевых сигналов [1–3]. В этом контексте особый интерес представляет пептид HCRG21 — рекомбинантный 56-аминокислотный полипептид, найденный при транскриптомном профилировании морской анемоны *Heteractis magnifica*. Этот пептид является высокоспецифичным блокатором TRPV1-каналов (IC_{50} = 6,9 мкМ) и демонстрирует уникальные фармакологические свойства: длительное анальгетическое действие (до 13 ч), выраженный гипотермический эффект (снижение температуры тела на 1,5 °С) и противовоспалительную активность [4]. Все это позволяет рассматривать пептид HCRG21 в качестве перспективного кандидата для разработки нового поколения анальгетиков.

Целью данной работы являлось воспроизведение и адаптация лабораторной технологии получения HCRG21 для оценки возможности ее масштабирования в условиях опытно-промышленного производства. Исходная технология предусматривала использование штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/pSMT3_HCRG21, синтезирующего гибридный белок SMT3-HCRG21, который затем подвергался ферментативному расщеплению с помощью Ulp1-протеазы с последующей очисткой целевого пептида. В ходе работы в технологический процесс был внесен ряд существенных модификаций. Прежде всего, в качестве продуцента был использован штамм *E. coli* Origami2(K12)/pLysS/pSMT3_HCRG21, что позволило повысить стабильность синтеза целевого белка. Оп-

* Исследование выполнено за счет средств субсидии федерального бюджета в рамках реализации Программы развития Дальневосточного федерального университета в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© А. А. Рар, Е. А. Волосникова, Т. И. Есина, Я. С. Гогина, Н. Г. Мотовилова, Е. Д. Даниленко, В. Н. Степаненко, М. Н. Терешин, Е. В. Лейченко, 2025

тимизация условий культивирования обеспечила выход биомассы на уровне 6,7 г/л с содержанием целевого белка 40 % и 13,15 г/л при его 35%-м содержании.

На этапе выделения и очистки были применены следующие ключевые усовершенствования: замена сепаратора на высокоскоростную центрифугу для сбора биомассы, введение дополнительной стадии центрифугирования для осветления лизата и модификация ионообменной хроматографии на Q-сефарозе с использованием ступенчатого градиента. Эти изменения позволили повысить эффективность очистки и выход целевого продукта. В результате проведенных работ были получены серии лиофилизированной субстанции HCRG21, соответствующей требованиям НД по чистоте (⩾ 97 %).

Проведенные исследования подтвердили возможность успешного масштабирования технологии производства HCRG21, что открывает перспективы для его дальнейшего внедрения в практику. Оптимизированная технология получения HCRG21 представляет собой важный шаг в создании современных анальгетиков с улучшенными характеристиками.

Литература

1. Salat K., Moniczewski A., Librowski T. Transient receptor potential channels — emerging novel drug targets for the treatment of pain // Curr. Med. Chem. 2013. Vol. 20 (11). P. 1409–1436.

2. Julius D. TRP channels and pain // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2013. Vol. 29. P. 355–384.

3. Синцова О. В., Паликов В. А., Паликова Ю. А. и др. Пептидный блокатор ионного канала TRPV1 проявляет длительный анальгетический эффект в модели тепловой стимуляции // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 493 (1). С. 423–426.

4. Sintsova O., Gladkikh I., Klimovich A. et al. TRPV1 blocker HCRG21 suppresses TNF-α production and prevents the development of edema and hypersensitivity in carrageenan-induced acute local inflammation // Biomedicines. 2021. Vol. 9 (7), No. 716.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-121

КОНЪЮГАТЫ БЕЛКА А С АНТИГЕНОМ УСИЛИВАЮТ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ *

PROTEIN A-ANTIGEN CONJUGATES ENHANCE IMMUNE RESPONSE WHEN ADMINISTERED INTRANASALLY

А. А. Рар, Е. А. Волосникова, Т. И. Есина, Н. В. Волкова, Д. Н. Щербаков

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

A. A. Rar, E. A. Volosnikova, T. I. Esina, N. V. Volkova, D. N. Shcherbakov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ raranas@yandex.ru

Аннотация

Исследование демонстрирует эффективность конъюгатов рекомбинантного белка А *Staphylococcus aureus* с RBD-доменом SARS-CoV-2 (вариант Delta) для интраназальной вакцинации. Применение сшивающих агентов Sulfo-SMCC и EDC позволило получить стабильные комплексы, индуцирующие высокие титры специфических IgG (до 10^5) у мышей, что подтверждает перспективность разработки мукозальных вакцин на основе конъюгатов белка А с антигенами респираторных патогенов.

Abstract

The study demonstrates the efficacy of recombinant *Staphylococcus aureus* protein A conjugated with the SARS-CoV-2 RBD domain (Delta variant) for intranasal vaccination. Cross-linking agents Sulfo-SMCC and EDC enabled stable complexes inducing high titers of specific IgG (up to 10^5) in mice, which confirms the prospects for the development of mucosal vaccines based on conjugates of protein A with antigens of respiratory pathogens.

Современная вакцинология сталкивается с ключевой проблемой — необходимостью создания эффективных мукозальных вакцин против респираторных инфекций. Слизистые оболочки дыхательных путей служат первичным барьером для патогенов, включая SARS-CoV-2 и вирусы гриппа. Однако разработка интраназальных вакцин осложняется рядом факторов: быстрым клиренсом антигенов со слизистой, относительно слабым иммунным ответом на слизистых, необходимостью преодоления эпителиального барьера [1, 2].

В данном контексте белок А *Staphylococcus aureus* (SpA) представляет особый интерес как потенциальный адъювант благодаря способности специфически связывать Fc-фрагменты иммуноглобулинов, возможности усиливать презентацию антигена и стабильности при конъюгации с различными антигенами [3, 4].

Для получения конъюгатов использовали рекомбинантные белки: RBD (рецептор-связывающий домен поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, вариант B.1.617.2 (Delta)) и Z-домен белка А — и применяли два сшивающих агента: Sulfo-SMCC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) и EDC (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид). Использовали стехиометрическое соотношение 1 : 1 (RBD : SpA), амидные группы восстанавливали добавлением боргидрида натрия в соотношении 1 : 10 (белок RBD : боргидрид натрия). От несвязавшихся компонентов освобождались гель-фильтрацией на сефакриле S-200.

Исследование иммуногенных свойств проводили на мышах линии Balb/c (n = 80). Схема иммунизации включала двукратное интраназальное введение с интервалом 14 дней. В качестве контрольных групп использовали RBD (в/м и интраназально) и физиологический раствор. Для определения титров специфических антител использовался ИФА. Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 8.0 (критерий Манна — Уитни).

Эксперименты показали, что конъюгаты белка А с RBD SARS-CoV-2, полученные с использованием Sulfo-SMCC или EDC, индуцировали высокие титры специфических IgG (до 10^5) при интраназальном введении мышам, что статистически значимо ($p \leqslant 0{,}05$) превышало показатели группы, получавшей RBD без адъюванта. Оба конъюгата продемонстрировали иммуногенность, сопоставимую с наблюдаемой при внутримышечным введении антигена, обеспечивали структурную целостность компонентов и стабильность при хранении (2–8 °C, 30 дней). Однако наблюдалась гетерогенность иммунного ответа, связанная, по-видимому, с вариабельностью всасывания на слизистой.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГЗ-1/22).
© А. А. Рар, Е. А. Волосникова, Т. И. Есина, Н. В. Волкова, Д. Н. Щербаков, 2025

Проведенное исследование демонстрирует, что конъюгаты рекомбинантного белка А *Staphylococcus aureus* с RBD-доменом SARS-CoV-2, полученные с использованием сшивающих агентов Sulfo-SMCC и EDC, являются примером перспективного подхода создания интраназальных вакцин, обеспечивая значительное усиление гуморального иммунного ответа (титры IgG до 10^5). Несмотря на наблюдаемую гетерогенность всасывания на слизистой, сопоставимая с наблюдаемой при внутримышечным введении иммуногенность, стабильность препаратов и сохранение структурной целостности компонентов в составе конъюгатов подтверждают перспективность дальнейшей разработки мукозальных вакцин на основе белка А против широкого спектра респираторных патогенов, включая SARS-CoV-2. В то же время требуются дополнительные исследования по оптимизации состава, изучению местного IgA-ответа и расширению спектра целевых антигенов.

Литература

1. Borges O., Borchard G. Mucosal vaccination: opportunities and challenges // Novel immune potentiators and delivery technologies for next generation vaccines. Springer US, 2013. P. 65–80.

2. Li M., Wang Y., Sun Y. et al. Mucosal vaccines: Strategies and challenges // Immunol. Lett. 2020. Vol. 217. P. 116–125.

3. Silverman G. J., Goodyear C. S., Siegel D. L. On the mechanism of staphylococcal protein A immunomodulation // Transfusion. 2005. Vol. 45 (2). P. 274–280.

4. Xing M., Hu G., Wang X. et al. An intranasal combination vaccine induces systemic and mucosal immunity against COVID-19 and influenza // NPJ Vaccine. 2024. Vol. 9 (1). Art. 64.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-122

К ВОПРОСУ О КОЛЛОИДНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ

ON THE ISSUE OF COLLOIDAL STABILITY OF FOOD SYSTEMS

О. С. Рзянкин, О. В. Салищева

Кемеровский государственный университет

O. S. Rzyankin, O. V. Salishcheva

Kemerovo State University

✉ oleg.r0804@gmail.com

Аннотация

Оценка коллоидной стабильности пищевых систем включает в себя выявление факторов, способствующих агрегированию коллоидно-дисперсных частиц, что приводит к помутнению системы, а также обоснование выбора подходов и методов, направленных на повышение коллоидной стабильности пищевых систем. В данной работе представлены подходы к повышению коллоидной стабильности жидких пищевых систем.

Abstract

Evaluation of the colloidal stability of food systems includes the identification of factors that contribute to the aggregation of colloid-dispersed particles, which leads to clouding of the system, as well as the justification for the choice of approaches and methods aimed at increasing the colloidal stability of food systems. This paper presents approaches to improving the colloidal stability of liquid food systems.

Оценка коллоидной стабильности пищевых систем включает в себя выявление факторов, способствующих агрегированию коллоидно-дисперсных частиц, что приводит к помутнению системы, а также обоснование выбора подходов и методов, направленных на повышение коллоидной стабильности пищевых систем.

Коллоидная стабильность напитков представляет собой способность сохранять прозрачность и избегать образования мутных осадков в процессе хранения. Ухудшение этой стабильности может привести к образованию нежелательной мути либо осадка, что негативно сказывается на органолептических свойствах напитка. Помутнение пива является распространенной проблемой, которая снижает его потребительскую привлекательность и сокращает срок хранения. В данной работе рассматриваются основные причины помутнения пива, а также современные методы повышения его коллоидной стабильности.

Увеличение мутности пива может быть обусловлено рядом факторов, таких как рост концентрации белков и полифенолов [1]. Для оценки мутности пива используются специальные приборы — мутномеры, которые измеряют степень мутности при различных углах расположения светового детектора.

В пивоварении для борьбы с коллоидными помутнениями применяются специальные сорбенты, которые действуют в двух ключевых направлениях: удаление белков и устранение фенольных соединений, способствующих образованию хлопьев. Для эффективного избавления от нежелательных белковых помутнений в производстве пива используются такие материалы, как гидрогели, ксерогели и силикагели. В то же время для нейтрализации хлопьеобразующих фенолов применяются различные препараты на основе поливинилполипирролидона.

Современные методы обработки пива часто оказываются экономически затратными. Это подчеркивает необходимость поиска инновационных подходов к устранению помутнений, которые сохраняли бы все ценные характеристики продукта, а также удаляли бы нежелательные белково-полифенольные комплексы, тем самым повышая стабильность пива. Помимо совершенствования технологического процесса для повышения коллоидной стабильности в настоящее время применяют химические вещества и ферментные препараты. Для этих целей перспективен полимер хитозан. Хитозан — это гидроколлоид полисахаридной природы, который получается в результате деацетилирования хитина [2]. В отличие от традиционных сорбентов и стабилизаторов, хитозан обладает многофункциональными свойствами, позволяющими эффективно взаимодействовать с различными компонентами пищевых систем, в частности, хитозан эффективно связывает отрицательно заряженные полифенольные вещества. Эта уникальная способность хитозана объясняется его химическим строением. Присутствие значительного количества аминогрупп и гидроксильных групп, а также высокая реакционная способность позволяют модифицировать его поверхность с помощью различных реагентов, что повышает его связующие свойства.

© О. С. Рзянкин, О. В. Салищева, 2025

Одним из современных методов улучшения коллоидной стабильности является фильтрация системы с использованием различных сорбционных материалов, включая биосорбенты [3]. Кизельгур, благодаря своей структуре и высокой способности к адсорбции, обеспечивает качественное удаление нежелательных компонентов, что способствует получению прозрачного и стабильного продукта. Этот метод заключается в создании фильтрующего слоя из диатомового порошка различных фракций, который наносится на такие поверхности, как фильтровальная панель, сито или металлическая свеча. Пиво проходит через этот слой, в результате чего задерживаются взвешенные частицы. Важной особенностью данного подхода является постоянное обновление фильтрующего слоя за счет регулярного дозирования диатомитовой смеси, что обеспечивает высокую эффективность фильтрации и способность удерживать примеси. Для эффективного задержания коллоидных частиц в процессе фильтрации пива к кизельгуровому фильтру добавляют силикагель и другие материалы, способствующие коллоидной стабилизации.

Современные подходы к стабилизации пищевых систем, включая применение адсорбентов, ферментов и усовершенствование технологических процессов, открывают новые возможности для достижения повышенной коллоидной устойчивости пищевых систем, которая обеспечивает и высокое качество, и срок хранения самой системы.

Литература

1. Дедегкаев А. Т. Коллоидные помутнения в пиве. Причины их возникновения // Индустрия напитков. 2005. № 2. С. 20–26.

2. Гужинов А. В., Салищева О. В. Функциональный хитозан-альгинатный гидрогель // Пищевые технологии. Сб. тез. III Междунар. симпозиума, посвящ. 90-летию со дня рождения Льва Александровича Остроумова. Кемерово. 2024. С. 48–50.

3. Лашицкий С. С., Салищева О. В. Исследование адсорбционных свойств модифицированных биосорбентов // Инновационный конвент «Образование, наука, инновации. Молодежный вклад в развитие научно-образовательного центра „Кузбасс“». Кемерово. 2019. С. 357–360.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-123

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ГРУНТА, ЗАГРЯЗНЕННОГО МАЗУТОМ В РЕЗУЛЬТАТЕ ТЕХНОГЕННОЙ АВАРИИ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ [*]

CHARACTERIZATION OF SOIL MICROBIOTA CONTAMINATED WITH FUEL OIL AS A RESULT OF A TECHNOGENIC ACCIDENT IN THE KRASNODAR REGION

В. А. Романова, Т. В. Григорьева, А. В. Лайков

Казанский (Приволжский) федеральный университет

V. A. Romanova, T. V. Grigoryeva, A. V. Laikov

Kazan Federal University

✉ avonamora-94@mail.ru

Аннотация

В исследовании дана характеристика микробиоты грунта прибрежной зоны Краснодарского края. Установлены различия образцов грунта по уровню загрязнения и проведен анализ доминирующих микроорганизмов. В наиболее загрязненных образцах преобладали представители рода *Pseudomonas*, в менее загрязненных — *Acinetobacter* и *Pseudomonas*.

Abstract

In the present study, the soil microbiota of the coastal zone of the Krasnodar Region was characterized. The soil samples differed in contamination levels, and the predominant microbial genera were analyzed. In the most contaminated samples, members of the genus *Pseudomonas* were predominant, while *Acinetobacter* and *Pseudomonas* dominated in samples with lower contamination levels.

Разливы дизельного топлива и мазута представляют особую угрозу для экосистемы. Обладая разной плотностью и физико-химическими свойствами, углеводороды такого вида формируют долгосрочные очаги загрязнения в водных и почвенных биотопах. Мазут, оседая на дне водоемов, разрушает донные биоценозы и нарушает почвенные процессы. Так, в декабре 2024 г. в Керченском проливе произошел разлив около 3,7 тыс. тонн мазута, спровоцировав масштабную экологическую катастрофу с загрязнением побережья Краснодарского края и Крыма, гибелью морских обитателей и введением режима чрезвычайной ситуации в регионах. Микроорганизмы играют ключевую роль в процессах биоремедиации благодаря способности метаболизировать широкий спектр загрязняющих веществ. Таким образом, цель данного исследования — изучить микробиоту грунта, загрязненного мазутом, отобранного в прибрежной зоне Краснодарского края.

Из нескольких участков прибрежной зоны Краснодарского края отобрано 4 образца грунта с разной степенью загрязнения. Для оценки степени загрязнения проводили экстракцию общих углеводородов и определяли их количество гравиметрическим методом. Для анализа микробного сообщества водную вытяжку грунта высевали на питательные среды с различными источниками углерода (сахароза, гексадекан, нафталин). Идентификацию организмов проводили с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Образцы № 1 и 2 представляют собой мазуты с небольшим количеством песка и характеризуются наибольшей степенью загрязнения. Содержание углеводородов составляют 308 и 226 г/кг соответственно. Каждый из образцов № 3 и 4 содержит преимущественно песок с примесью мазута; содержание углеводородов составляет 158 и 145 г/кг соответственно. Общая численность микроорганизмов во всех образцах на среде с сахарозой или гексадеканом составляет от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл. На среде с нафталином численность микроорганизмов оказалась значительно ниже и составляет от 10^3 до 10^4 КОЕ/мл, поскольку, вероятно, нафталин угнетает общую активность микроорганизмов. В то же время присутствие некоторых доминирующих изолятов в исследуемых образцах свидетельствует об их устойчивости к ароматическим углеводородам. Результаты MALDI/TOF-масс-спектрометрии показали, что в наиболее загрязненных образцах преобладали представители рода *Pseudomonas*, включая *P. putida* и *P. stutzeri*, в наименее загрязненных образцах — представители рода *Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Более высокая численность микроорганизмов наблюдалась в наименее загрязненных образцах, что, предположительно, связано с низкой степенью загрязнения и высокой аэрацией субстрата. Представители рода *Pseudomonas* широко распространены в загрязненных углеводородами почвах. Наличие данных представителей во всех исследуемых

[*] Исследование выполнено в рамках проекта № FZSM-2023-0013.

© В. А. Романова, Т. В. Григорьева, А. В. Лайков, 2025

образцах может говорить о высоком потенциале использования вышеупомянутых углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки загрязненных объектов.

Таким образом, микробиота грунта, загрязненного мазутом, обладает потенциалом как для естественного очищения благодаря присутствию микроорганизмов-деструкторов, так и для стимулирования этих процессов с помощью методов биоремедиации.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-124

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОК *PARACOCCUS YEEI* ВКМ B-3302 ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИОГИБРИДНОГО КАТАЛИЗАТОРА *

APPLICATION OF *PARACOCCUS YEEI* VKM B-3302 CELLS FOR THE PREPARATION OF BIOHYBRID CATALYST

П. В. Рыбочкин, В. Н. Соромотин, О. А. Каманина

Тульский государственный университет

P. V. Rybochkin, V. N. Soromotin, O. A. Kamanina

Tula State University

✉ rybochkin.pavel.vl@mail.ru

Аннотация

В настоящее время активно изучают применение бактерий для биотехнологического получения наночастиц Pd и создания катализаторов. Клетки бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ B-3302 использовали для формирования наночастиц палладия и приготовления биогибридного катализатора. Полученный катализатор представляет собой наночастицы палладия на поверхности и внутри клеток бактерий и обеспечивает высокий выход продуктов реакций Мизороки — Хека и Сузуки — Мияуры.

Abstract

Currently, the utilization of bacteria for the biotechnological production Pd nanoparticles and create catalysts is being actively studied. *Paracoccus yeei* VKM B-3302 bacterial cells were used to form palladium nanoparticles and prepare a biohybrid catalyst. The resulting catalyst is palladium nanoparticles on the surface and inside the bacterial cells. The catalyst provides a high yield of the Mizoroki-Heck and Suzuki-Miyarua reaction products.

Катализаторы необходимы для промышленного производства. Доля применения гетерогенных катализаторов составляет около 80–90 %, что связано с возможностью их отделения от реакционной смеси и многократного применения. Высокой активностью обладают катализаторы, представляющие собой наночастицы металлов на носителе. Особое значение имеют наночастицы палладия, благодаря его высокой каталитической активности и большому набору катализируемых реакций. Носитель не только обеспечивает возможность многократного применения катализатора, но и стабилизирует наночастицы, препятствуя их агломерированию и росту.

В качестве носителей наночастиц палладия используют различные углеродные материалы, неорганические носители в виде оксидов элементов (SiO_2, Al_2O_3, TiO_2, MgO, CeO_2 и др.). Для формирования и нанесения наночастиц применяют физические (лазерная абляция, осаждение из паровой фазы, магнетронное распыление) и химические (пропитка, золь-гель-метод, электрохимическое осаждение, применение ультразвука, в сверхкритической жидкости и др.) методы [1].

Активно изучают биогибридные катализаторы, полученные биотехнологическим путем с использованием клеток микроорганизмов [2]. Такой катализатор представляет собой наночастицы палладия внутри или на поверхности клетки. Получение наночастиц палладия с использованием клеток бактерий отличается меньшими энергетическими затратами, мягкими условиями, экологичностью по сравнению с традиционными физическими и химическими методами. Большинство существующих работ направлены на получение наночастиц палладия с применений бактерий анаэробов или факультативных анаэробов.

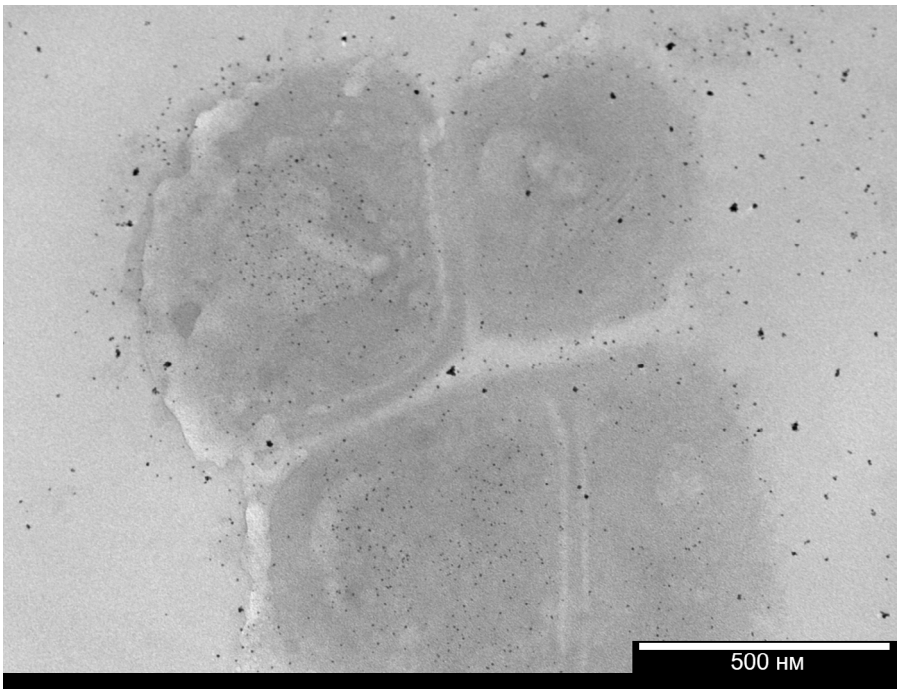
В рамках работы клетки аэробных бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ B-3302 (*P. yeei*), выделенные из сточных вод, применили для получения биотехнологическим путем катализатора Pd/*P. yeei*. Для приготовления катализатора использовали методику, подразумевающую подачу водорода к смеси бактерий и ацетата палладия в дистиллированной воде с последующей сушкой на воздухе в течение 48 ч [3]. Полученный катализатор представляет собой наночастицы Pd, находящиеся внутри и на поверхности клеток (рис. 1).

Перед тестированием в реакции катализатор изучали различными методами. Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой продемонстрировала, что при целевой загрузке палладия в 5 масс.% на бактериях находится 4,4 масс.% металла. Средний размер наночастиц 4 нм. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС) показала, что в биогибридном катализаторе палладий присутствует в трех формах: Pd(0), PdO и неизвест-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-73-10013).

© П. В. Рыбочкин, В. Н. Соромотин, О. А. Каманина, 2025

ная форма палладия Pd(x) (рис. 2, *а*). Неизвестная форма палладия с пиком 3d5/2 при энергии связи в 338,0 эВ, возможно, представляет собой комплекс металла с компонентами клеток. Комплекс, по всей видимости, недостаточно окристаллизован, так как по методу рентгенофазового анализа (РФА) зафиксирован только палладий в гранецентрированной кубической сингонии (см. рис. 2, *б*).



б

Рис. 1. Клетки *P. yeei* с наночастицами Pd после приготовления катализатора

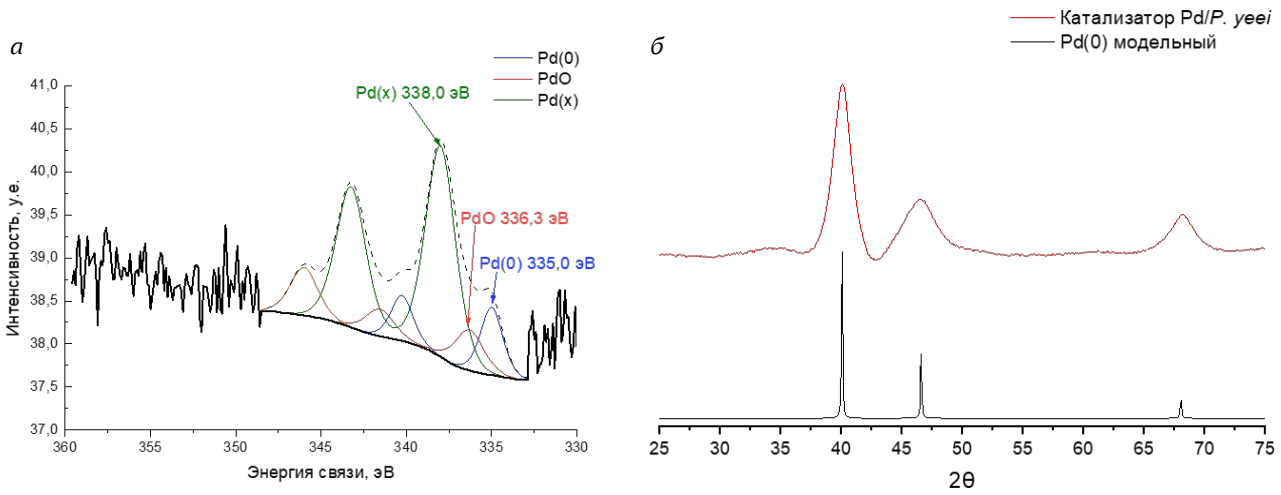


Рис. 2. Результаты исследования катализатора Pd/*P. yeei* рентгеновскими методами анализа:
а — спектр РФЭС; *б* — дифрактограммы РФА

Катализатор испытывали в реакциях Мизороки — Хека и Сузуки — Мияуры с различными субстратами в сравнении с коммерчески доступным катализатором палладием на активированном угле (Pd/C). Полученный биотехнологическим путем катализатор обеспечивает высокий выход продукта реакции, сопоставимый с коммерческим катализатором Pd/C. При этом Pd/*P. yeei* можно использовать не менее чем в 5 последовательных циклах с незначительным падением выхода продукта [4].

Таким образом, была показана возможность применения аэробных бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ B-3302 для биотехнологического получения наночастиц палладия и приготовления катализатора Pd/*P. yeei*, который способен эффективно катализировать реакции сочетания C–C.

Литература

1. Joudeh N., Saragliadis A., Koster G. et al. Synthesis methods and applications of palladium nanoparticles: A review // Frontiers in Nanotechnology. 2022. Vol. 4. P. 1–24.

2. Egan-Morriss C., Kimber R. L., Powell N. A., Lloyd J. R. Biotechnological synthesis of Pd-based nanoparticle catalysts // Nanoscale Advances. 2022. Vol. 4, No. 3. P. 654–679.

3. Kamanina O. A., Rybochkin P. V., Borzova D. V. et. al. Sustainable catalysts in a short time: harnessing bacteria for swift palladium nanoparticle production // Nanoscale. 2025. Vol. 17. P. 5289–5300.

4. Rybochkin P. V., Perchikov R. N., Karlinskii B. Ya. et. al. Aerobic bacteria-supported biohybrid palladium catalysts for efficient cross-coupling reactions // Journal of Catalysis. 2024. Vol. 429. P. 115238.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-125

ЭФФЕКТЫ ИСКУССТВЕННОЙ РНКАЗЫ $DL_4$12 НА ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ *

EFFECTS OF ARTIFICIAL RNASE $DL_4$12 ON GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Е. С. Рябова, А. В. Тупицына, А. В. Бардашева, А. Е. Григорьева, Д. А. Задворных, Е. И. Рябчикова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. S. Ryabova, A. V. Tupitsyna, A. V. Bardasheva, A. E. Grigor'eva, D. A. Zadvornykh, E. I. Ryabchikova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ e.ryabova@alumni.nsu.ru

Аннотация

Проблема устойчивости бактерий к существующим антибиотикам является актуальной для медицины, что определяет важность разработки соединений с новыми механизмами действия. В данном исследовании показаны эффекты искусственной РНКазы $DL_4$12 на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Abstract

The problem of bacterial resistance to existing antibiotics is relevant for medicine, which determines the importance of developing compounds with new mechanisms of action. This study shows the effect of artificial RNase $DL_4$12 on gram-positive and gram-negative bacteria.

Цель исследования — изучить эффекты искусственной РНКазы $DL_4$12 на грамположительные (грам+) и грамотрицательные (грам−) бактерии с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Объекты исследования: грам+ *Enterococcus faecalis и Staphylococcus aureus* и грам− *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa и Salmonella enterica*.

Суспензии бактерий инкубировали с соединением $DL_4$12 (концентрация 0,01 мМ) в течение 15 мин. Действие соединения $DL_4$12 на бактерии останавливали добавлением 25%-го раствора глутаральдегида (1 : 100), суспензию центрифугировали (10 мин), осадки фиксировали по методу Райтера — Келленбергера (1 % OsO_4 на 0,2 М цитратном буфере pH 6, в течение ночи при 22 °С; осадки промывали цитратным буфером и пост-фиксировали 0,5%-м раствором уранила ацетата pH 3 в течение 2 ч). Полученные осадки обезвоживали, заливали в эпоксидную смолу. Ультратонкие (70–80 нм) срезы готовили на ультрамикротоме Leica EM UC7, контрастировали растворами уранила ацетата и цитрата свинца. Срезы изучали в ПЭМ JEM 1400 (Jeol, Япония). Цифровые изображения получали с помощью камеры Veleta (EM SIS) с пакетом программ iTEM версии 5.2 (EM SIS).

Взаимодействие искусственной РНКазы $DL_4$12 с бактериальной клеткой начинается с контакта с оболочкой. Оболочка грам+ бактерий: 1) клеточная стенка; 2) промежуточный слой; 3) цитоплазматическая мембрана (ЦПМ). Оболочка грам− бактерий: 1) внешняя мембрана; 2) периплазматическое пространство (ППП), у *A. baumannii* в ППП визуализируется слой пептидогликанов; 3) внутренняя мембрана.

В зависимости от вида бактерии и ее строения морфологический эффект соединения $DL_4$12 различен. Грам+ *S. aureus*: разрыхление клеточной стенки; увеличение ширины промежуточного слоя; появление рыхлого вещества в промежуточном слое; фрагментация ЦПМ; образование слоистых включений по периферии ЦПМ. Грам+ *E. faecalis*: резкое снижение контрастности промежуточного слоя; ЦПМ более структурирована; образование слоистых включений по периферии ЦПМ.

Грам− *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *S. enterica*: выравнивание складок внешней мембраны; образование в ППП слоистых включений, предположительно сформированных внутренней мембраной. Особенности *A. baumannii*: между внешней мембраной и слоем пептидогликанов в ППП выявляется рыхлый материал средней электронной плотности; на всей поверхности внешней мембраны появляются скопления материала средней электронной плотности разной формы, формируя «опушку».

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300656-5.

© Е. С. Рябова, А. В. Тупицына, А. В. Бардашева, А. Е. Григорьева, Д. А. Задворных, Е. И. Рябчикова, 2025

Изменения цитоплазмы под воздействием РНКазы $DL_4$12: у всех бактерий наблюдается гомогенная цитоплазма; рибосомы исчезают. Изменения нуклеоида: у всех бактерий регистрируется компактизация нуклеоида; меняется взаимное расположение нитей ДНК.

Таким образом, выявленные ультраструктурные изменения подтверждают способность искусственной РНКазы $DL_4$12 повреждать ключевые структуры бактериальной клетки. Полученные данные говорят о широком спектре действия соединения $DL_4$12 и могут быть использованы для разработки новых антибактериальных соединений на его основе.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-126

ДНК-АПТАМЕРЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ: ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ СТРУКТУРЫ И АФФИННОСТИ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ *

DNA APTAMERS BINDING SMALL MOLECULES: STUDIES OF STRUCTURE-AFFINITY RELATIONSHIPS AND ANALYTICAL APPLICATIONS

А. В. Самохвалов, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

A. V. Samokhvalov, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow

✉ alvlsamokh@yandex.ru

Аннотация

Работа посвящена изучению структурных особенностей аптамеров для обеспечения их высокой аффинности к целевым лигандам. Охарактеризованы панели аптамеров, отличающиеся по составу участка, стабилизирующего их третичную структуру. Выявлены наиболее аффинные аптамеры, специфичные к антибиотикам (канамицин, хлорамфеникол) и микотоксинам (афлатоксин B1, охратоксин A). Рассмотрено их применение в биоаналитических системах.

Abstract

The work is devoted to the study of structural features of aptamers to ensure their high affinity to target ligands. Panels of aptamers differing in the composition of the region stabilizing their tertiary structure are characterized. The most affinity aptamers specific to antibiotics (kanamycin, chloramphenicol) and mycotoxins (aflatoxin B1, ochratoxin A) are identified. Their application in bioanalytical systems is considered.

Перспективным классом синтетических рецепторных молекул являются одноцепочечные олигонуклеотиды — аптамеры. Их конкурентный потенциал определяется простотой синтеза и модификации, возможностью эффективной ренатурации, сочетающимися с высокой аффинностью и селективностью. Несмотря на значительное число описанных аптамеров, распознающих разнообразные практически значимые лиганды, их аналитическое применение сопровождается рядом сложностей и требует дополнительного дизайна молекул, объединяющего обоснованный выбор лиганд-связывающих и стабилизирующих элементов структуры. Востребованность этих разработок определило цель проведенного исследования, направленного на изучение изменений аффинности аптамеров к различным низкомолекулярным лигандам при варьировании их структуры.

В работе были рассмотрены ДНК-аптамеры, связывающие антибиотики канамицин и хлорамфеникол, а также микотоксины афлатоксин B1 и охратоксин A. С использованием программных средств NUPACK (https://www.nupack.org/) и RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at/) охарактеризованы варианты данных аптамеров с различными участками вне лиганд-связывающих сайтов. Проведена теоретическая оценка формирования элементов вторичной структуры — петли, шпильки, неспаренные хвосты и др. На основании расчетных данных об энергии Гиббса вторичной структуры и сайтах уотсон-криковских взаимодействий выбраны и синтезированы панели аптамеров, реализующих разные способы стабилизации лиганд-связывающих сайтов.

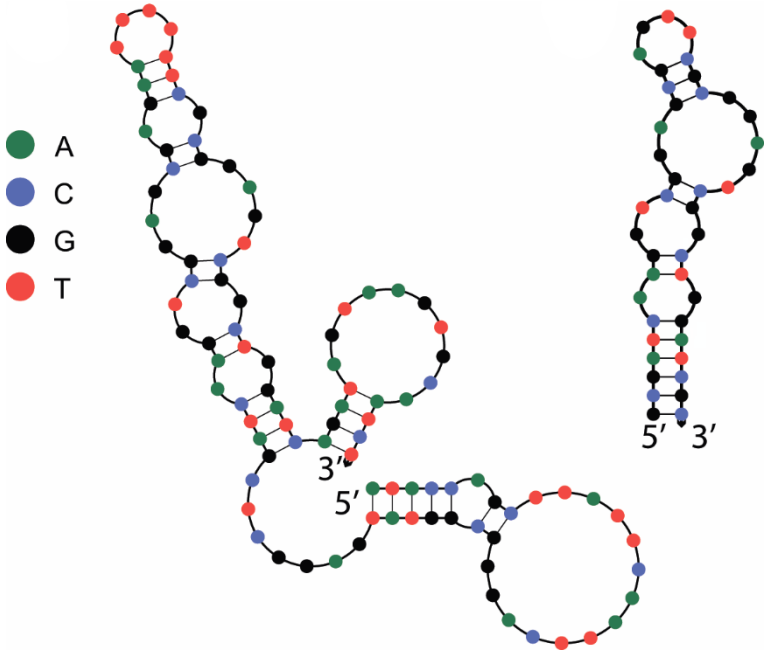
Проведена экспериментальная характеристика констант диссоциации (K_D) комплексов полученных аптамеров при взаимодействии с нативными и флуоресцентно меченными лигандами. Взаимодействия изучались методами изотермической калориметрии, микротермофореза и регистрации анизотропии флуоресценции. Установлены величины K_D для взаимодействий в средах, отличавшихся по pH и ионной силе, а также при варьировании температурного режима.

В частности, сопоставлено восемь вариантов канамицин-связывающего аптамера. Сокращение длины олигонуклеотидной цепи с 93 до 43 звеньев и рост числа водородных связей с 10 до 19 в комплементарном участке, стабилизирующем предполагаемый сайт связывания (см. рисунок), привели к четырехкратному росту аффинности — изменению K_D с 904 ± 104 до 228 ± 55 нМ. Оптимальный буфер для взаимодействия аптамера с канамици-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-14-00421).

© А. В. Самохвалов, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев, 2025

ном — 10 мМ Трис-ацетат, 50 мМ NaCl, 3 мМ ацетат магния, pH 7,4. Сконструированный рецептор превосходит по аффинности ранее описанные аптамеры, специфичные к канамицину. Реализованные подходы представляются перспективными для дизайна других аптамеров, связывающих низкомолекулярные лиганды.



2D-структуры аптамеров к канамицину (NUPACK) при 24 °C в среде с 0,1 М Na^+, 0,01 М Mg^{2+}: *а* — исходный аптамер, *б* — выбранный аптамер с оптимизированной структурой

Охарактеризованные аптамеры применены в гомогенных конкурентных аналитических системах, основанных на регистрации анизотропии флуоресценции либо на фёрстеровском резонансном переносе энергии. Изучено использование в аналитических целях лиганд-индуцированного высвобождения коротких комплементарных олигонуклеотидов из комплексов с аптамерами. Показана возможность выявления афлатоксина B1 и охратоксина А в концентрациях до 3 нМ при одностадийном тестировании с продолжительностью не более 15 мин. Рассматриваются возможности увеличения чувствительности при использовании сконструированных вариантов аптамеров со стабилизированной структурой.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-127

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА ИСХОД СВОБОДНОЙ АУТОДЕРМОПЛАСТИКИ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ

EFFECT OF T-LYMPHOCYTE ACTIVATION ON THE OUTCOME OF FREE AUTODERMOPLASTY IN PATIENTS WITH BURN INJURY

П. А. Селиванов, Д. А. Ульянкин, С. А. Шилин

3-й Военный госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, Санкт-Петербург

P. A. Selivanov, D. A. Ulyankin, S. A. Shilin

3rd Military Hospital of the National Guard of the Russian Federation, Saint Petersburg

✉ olliwooood@gmail.com

Аннотация

Проведен анализ содержания активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер $CD3^+HLA\text{-}DR^+$, у пациентов с ожоговой травмой в динамике хирургического лечения методом свободной аутодермопластики. Выявлено пороговое значение относительного содержания активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер $CD3^+HLA\text{-}DR^+$, в предоперационный период с учетом исхода.

Abstract

The analysis of activated T-lymphocytes expressing the $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ marker in patients with burn injury in the dynamics of surgical treatment by free autodermoplasty (FADP) was carried out. The threshold value of the relative content of activated T-lymphocytes expressing the $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ marker in the preoperative period was revealed, considering the outcome.

Введение

Ожоговая травма (ОТ) является одной из наиболее острых медико-социальных проблем человечества. При закрытии пораженного дефекта в настоящее время используется метод свободной аутодермопластики (САДП). Развитие как краткосрочных, так и долгосрочных последствий в организме, в том числе в отношении иммунной системы начинается от момента получения ОТ и не заканчивается на пусть даже успешно проведенной САДП. Отмечается влияние на исход ожоговой травмы не только количественных изменений содержания тех или иных субпопуляций лимфоцитов, но и степени активации клеток. Чаще всего упоминается активационный маркер HLA-DR и его экспрессия на Т-лимфоцитах. Однако все эти данные в основном сводятся к обсуждению влияния этих показателей на выживаемость, а не на успех САДП.

Цель исследования — провести анализ относительного содержания активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер HLA-DR, у пациентов с ожоговой травмой при получении ожоговой травмы и после проведения САДП с целью определения влияния данной субпопуляции на исход оперативного вмешательства.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 99 человек. Критериями включения в группу обследованных пациентов (n = 64) с ОТ стали: возраст от 18 до 65 лет, ОТ I–IIIАБ степени тяжести, глубокие ожоги кожи на площади не менее 1 % поверхности тела. Критерии исключения: онкологические заболевания, тяжелые иммунодефицитные состояния в анамнезе, заболевания с поражением кожных покровов. Группу сравнения (n = 35) составили условно здоровые люди в возрасте от 18 до 65 лет, критерии исключения аналогичны таковым в основной группе.

Методом проточной цитометрии (Navios, Beckman Coulter, США) в многопараметрическом анализе проводили исследование параметров клеточного иммунитета на образцах цельной крови, забранной из локтевой вены натощак в утренние часы в вакутейнеры с К2ЭДТА. Все пробы периферической крови доставляли в лабораторию с соблюдением температурного режима и анализировали в тот же день. Исследование проводилось дважды — при поступлении в стационар, а также при первой перевязке после проведенной САДП, где и оценивались результаты исхода оперативного вмешательства.

Методика оценки субпопуляционного состава лимфоцитов включала использование панели моноклональных антител — HLA-DR/FITC, CD4/PE, CD3/ECD, CD56/PC5.5, CD25/PC7, CD8/APC, CD19/APC700, CD45/APC750 (Beckman Coulter, США).

© П. А. Селиванов, Д. А. Ульянкин, С. А. Шилин, 2025

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2016, пакета Statistica 12.0 (StatSoft, США). Сравнение выборок с определением достоверности различий проводили с использованием критерия Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

У всех участников были проведены исследования как относительного, так и абсолютного содержания активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер HLA-DR — $CD3^+HLA\text{-}DR^+$. В группе сравнения ($n = 35$) относительное содержание $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ составило 7,9 ± 4,0 %, а абсолютное 0,1 ± 0,08 × 10^9/л. В группе пациентов ($n = 64$), в первые сутки после получения ОТ относительное содержание $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ составило 12,8 ± 6,1 %, а абсолютное 0,1 ± 0,1 × 10^9/л. Значимые отличия обнаружены в сравнении относительного содержания активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер HLA-DR, между группами сравнения и исследования при получении ОТ ($p < 0,05$).

Всем пострадавшим с ОТ была проведена САДП. Далее группа обследованных пациентов была разделена на две в зависимости от успешности исхода САДП — с полным приживлением аутотрансплантата (ППА) ($n = 25$) и с частичным лизисом аутотрансплантата (ЧЛА) ($n = 28$). Показатели содержания активированных Т-лимфоцитов исследовали при первой перевязке после проведения САДП — 24 ± 12 суток.

В группе с ППА относительное содержание $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ составило 9,7 ± 2,0 %, а абсолютное 0,2 ± 0,09 × × 10^9/л, а в группе с ЧЛА 17,1 ± 6,6 и 0,2 ± 0,1 % соответственно. Значимые различия были обнаружены в обеих группах ($p < 0,05$). Несмотря на значимость различий, обращает на себя внимание значительное повышение относительного содержания активированных Т-клеток $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ в группе с ЧЛА по сравнению с пациентами из группы с ППА.

Методом ROC-анализа было определено пороговое значение относительного содержания $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ — 11,1 %, выше которого более вероятен неблагоприятный исход операции ($p < 0,0001$, чувствительность 96,43 %, специфичность 100 %).

Заключение

В отношении успешности САДП при ОТ значимым является показатель $CD3^+HLA\text{-}DR^+$ (менее 11,1 %), превышение пороговых значений повышает риск отторжения аутотрансплантата.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-128

МЕТААНАЛИЗ КРИТЕРИЕВ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫХ К ДОНОРАМ, ДЛЯ УСПЕШНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КУЛЬТУР «МИКРОБИОТИЧЕСКИХ» ОРГАНИЗМОВ *

META-ANALYSIS OF DONOR ELIGIBILITY CRITERIA FOR SUCCESSFUL ISOLATION OF VIABLE CULTURES OF "MICROBIOTIC" ORGANISMS

Е. О. Селло, К. С. Горбунов, Т. А. Савинова

НИИ системной биологии и медицины, Москва

E. O. Sello, K. S. Gorbunov, T. A. Savinova

Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow

✉ sello_eo@sysbiomed.ru

Аннотация

Кишечная микробиота разнообразна, и ее влияние на здоровье человека также многогранно. Кроме уже привычной фекотрансплантации, можно выделять отдельные бактерии, что повысит эффективность ввиду подселения пациенту достоверно жизнеспособных микроорганизмов. Мы провели метаанализ с целью изучения критериев доноров биоматериала для успешного выделения жизнеспособных культур.

Abstract

The gut microbiota is diverse and its impact on human health is multifaceted. In addition to the, already well known, fecal transplantation, it is possible to isolate separate bacteria, which will increase efficiency due to introduction of reliably viable microorganisms into the patient. We have conducted a meta-analysis aimed at studying the criteria for donors of biological material for successful isolation of viable cultures.

Цель

Невозможно представить полностью здоровым человека, страдающего от дисфункции одной из систем организма. Пищеварительный тракт и кишечник напрямую влияют на наше самочувствие, от их состояния зависит иммунитет и даже ментальное здоровье [1]. Стабильность обеспечивается в том числе микробиотой, населяющей ЖКТ, сейчас ее можно подселять пациентам в виде трансплантации или в качестве диетических добавок.

Вопрос критериев для доноров при фекотрансплантации достаточно детально проработан в литературе и утвержден в ряде рекомендаций. Вопрос критериев же для доноров, у которых возможно забирать биоматериал для последующего выделения и успешного культивирования полезных пробиотических штаммов, требует отдельной оценки.

Материалы и методы

Мы провели анализ 120 статей, описывающих сбор биоматериала, то есть фекальных масс, для последующего выделения и культивирования в них «пробиотических» микроорганизмов (*Lachnospiraceae*, *Ruminococci*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacteria* и др.) [2]. Также были изучены статьи, раскрывающие информацию о том, как наличие тех или иных заболеваний может влиять на успешность выделения и культивирования пробиотических микроорганизмов человека.

Результаты

Основными правилами успешного отбора доноров оказались индекс массы тела в пределах нормы, 20–25 кг/м^2, отсутствие системных заболеваний, таких как диабет, злокачественные новообразования, кишечные заболевания. В качестве общих требований по безопасности выдвигаются отсутствие ВИЧ-инфекции, гепатитов B и C, сифилиса [3]. Также есть более специфичные требования, влияющие на эффективность выделения: добровольцу не рекомендован прием препаратов-ингибиторов протонной помпы, иммуносупрессоров, не должно быть диареи, других заболеваний ЖКТ в анамнезе в ближайшие месяцы до взятия биоматериала.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 122030900062-5.

© Е. О. Селло, К. С. Горбунов, Т. А. Савинова, 2025

Была также обнаружена корреляция между эффективностью выделения и возрастом донора, показавшая, что молодые люди могут дать более качественный биоматериал.

Также упоминается, что донором фекальных масс не сможет стать потенциальный носитель резистентных микроорганизмов, то есть работники медицинских учреждений, часто посещающие их либо недавно перенесшие госпитализацию [4]. И делается упор на диету донора — он не должен злоупотреблять алкоголем, в меню должно быть много растительной пищи.

Выводы

Существуют определенные характеристики доноров фекальных масс, они общие, вне зависимости от добываемого вида культуры. Доноры должны быть здоровы, иметь нормальный индекс массы тела, включать в меню большое количество растительных волокон, не иметь системных заболеваний. Все это способствует микробиологическому разнообразию кишечной флоры, а также ее жизнеспособности, что важно для успешного выделения «пробиотических» микроорганизмов.

Хотя описываемые требования сходны с требованиями к донорам для пересадки фекальной микробиоты, данный результат не является тривиальным ввиду того, что отражает взаимосвязь успешности выделения микроорганизмов и состояния здоровья донора.

Литература

1. Sasso J. M., Ammar R. M., Tenchov R. et al. Gut microbiome-brain alliance: a landscape view into mental and gastrointestinal health and disorders // ACS Chemical Neuroscience. 2023. Vol. 14, No. 10. P. 1717–1763.

2. Porcari S., Benech N., Valles-Colomer M. et al. Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: from microbiome to clinic // Cell Host & Microbe. 2023. Vol. 31, No. 5. P. 712–733.

3. Camacho-Ortiz A., Gutiérrez-Delgado E. M., Garcia-Mazcorro J. F. et al. Randomized clinical trial to evaluate the effect of fecal microbiota transplant for initial Clostridium difficile infection in intestinal microbiome // PLoS ONE. 2017. Vol. 12, No. 12.

4. Carlson P. E. Jr. Regulatory considerations for fecal microbiota transplantation products // Cell Host & Microbe. 2020. Vol. 27. P. 173–175.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-129

НОВЫЕ ПОЛИАМИНОКСИДАЗЫ ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИАМИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ *

NEW POLYAMINE OXIDASES FROM THERMOTOLERANT YEAST FOR THE DETERMINATION OF POLYAMINES IN BIOLOGICAL FLUIDS

Е. П. Сергеев[1,2], Д. И. Головина[1,2], Д. Л. Атрошенко[1–3]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва*
[3] *Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва*

E. P. Sergeev[1,2], D. I. Golovina[1,2], D. L. Atroshenko[1–3]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Research Center of Biotechnology RAS, Moscow*
[3] *Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow*

✉ egor.sergeev@chemistry.msu.ru

Аннотация

Полиамины — низкомолекулярные соединения, являющиеся перспективным биомаркером различных патологий, в том числе при различных видах рака, нейродегенеративных заболеваниях. Одним из перспективных способов их анализа является ферментативное определение. В ходе нашей работы мы получили новые оксидазы полиаминов из дрожжей, перспективные для определения полиаминов в биологических жидкостях.

Abstract

Polyamines are low-molecular compounds that are promising biomarkers for various pathologies, including various types of cancer and neurodegenerative diseases. One of the suitable methods for their analysis is enzymatic determination. In the course of our work, we obtained new polyamine oxidases from yeast that have appropriate properties for determining polyamines in biological fluids.

Полиамины — продукты катаболизма аминокислот, участвующие в различных клеточных процессах. Их концентрация в биологических жидкостях человека может служить сигналом различных заболеваний, включая различные виды рака [1] и нейродегенеративные процессы [2]. На сегодняшний день наиболее распространенным методом их анализа является ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. Однако данный способ не позволяет работать с большим количеством образцов и требует дорогостоящего оборудования. В качестве альтернативы можно предложить ферментативный способ определения, основанный на использовании двух ферментов: оксидазы полиаминов и пероксидазы. Первый позволяет селективно окислять полиамины растворенным кислородом с образованием перекиси, второй — окислять при помощи перекиси фото- и флуорогенные субстраты.

В ходе работы мы клонировали гены, потенциально кодирующие полиаминоксидазы, из *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (3 гена), *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Lachancea thermotolerans* CBS 6340, *Sporopachyderma lactivora* Y-1647, *Cyberlindnera jadinii* Y-74, *Candida blankii* Y-2100. Из них при экспрессии в *Escherichia coli* нам удалось получить 5 ферментов в растворимой форме — все ферменты из *O. parapolymorpha* (**OpaPAO1–3**), фермент из *K. marxianus* (**KmaPAO**) и фермент из *L. thermotolerans* (**LtePAO**). Из них один из ферментов *O. parapolymorpha* — OpaPAO2 — не проявлял активности с типичными субстратами полиаминоксидаз, а фермент из *L. thermotolerans* синтезировался в крайне малом количестве и выделялся с низкой чистотой на металл-аффинной хроматографии. При этом ферменты OpaPAO1 и OpaPAO3 обладают специфичностью к ацилированным полиаминам, в то время как KmaPAO показал активность со всеми распространенными полиаминами. Исходя из этого, мы изучили основные физико-химические свойства этих трех ферментов.

Все ферменты обладают умеренной термостабильностью (температура плавления глобулы для всех ферментов выше 55 °C по данным анализа ThermoFAD [3]). OpaPAO1 показала высокую удельную активность и каталитические константы (более 100 $с^{-1}$ для каждого субстрата), в то время как OpaPAO3 и KmaPAO проявили более низкие активности со своими субстратами (каталитические константы в диапазоне 1–10 $с^{-1}$). Все ферменты

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00121).
© Е. П. Сергеев, Д. И. Головина, Д. Л. Атрошенко, 2025

наиболее активны при pH, близком к 9. Кроме того, нами было замечено, что при окислении $N^{1,12}$-диацетилспермина нашими ферментами образуется путресцин, что повышает эффективную чувствительность для данного соединения и требует дальнейшего учета при количественном анализе полиаминов, поскольку из одной молекулы субстрата получается две молекулы перекиси. Таким образом, OpaPAO1 наиболее хорошо подходит для анализа общего уровня ацилированных полиаминов, а KmaPAO — общего уровня полиаминов. В ходе дальнейшей работы мы планируем оптимизировать методику пробоподготовки и определения полиаминов в таких биологических жидкостях, как слюна и моча.

Литература

1. Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities // Nature Reviews Cancer. 2018. Vol. 18, Iss. 11. P. 681–695.

2. Saiki S., Sasazawa Y., Fujimaki M. et al. A metabolic profile of polyamines in Parkinson disease: a promising biomarker // Annals of Neurology. 2019. Vol. 86, Iss. 2. P. 251–263.

3. Forneris F., Orru R., Bonivento D. et al. Thermo FAD, a Thermofluor®-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding // The FEBS Journal. 2009. Vol. 276. P. 2833–2840.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-130

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ АРМИРОВАННОЙ РНК НА ПРИМЕРЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR OBTAINING REINFORCED RNA USING THE EXAMPLE OF A POSITIVE CONTROL SAMPLE FOR A PCR TEST SYSTEM

И. А. Смирнова, Г. В. Тымбур, Е. В. Расторгуева, Д. А. Викторов

Ульяновский государственный университет

I. A. Smirnova, G. V. Tymbur, E. V. Rastorgueva, D. A. Viktorov

Ulyanovsk State University

✉ inna.smirnova.01@bk.ru

Аннотация

Армированная РНК, как устойчивый положительный контрольный образец (ПКО), позволяет повысить качество исследований при постановке ОТ-ПЦР благодаря снижению количества ложноотрицательных результатов. Упаковка РНК в капсид фага MS2 увеличивает устойчивость целевого фрагмента к действию нуклеаз, это позволяет создавать стабильные ПКО для ОТ-ПЦР-тест-систем.

Abstract

Armored RNA, as a stable positive control sample (PCS), makes it possible to improve the quality of RT-PCR studies by reducing the number of false negative results. The packaging of RNA in the capsid of the MS2 phage increases the resistance of the target fragment to the action of nucleases, which makes it possible to create stable PCS for RT-PCR test systems.

Постановка ПЦР для диагностики заболеваний требует ПКО, содержащего стабильную мишень. В случае выявления РНК-мишеней ПКО также должен представлять собой РНК-мишень. В настоящее время наиболее актуально использование в качестве ПКО генно-инженерных продуктов. С помощью генной инженерии можно получать ПКО с заданными свойствами, которые будут более устойчивы к действию нуклеаз, такие как армированная РНК.

Армированная РНК — это разновидность неинфекционной рекомбинантной вирусоподобной частицы (ВПЧ), содержащей целевую экзогенную РНК. Она является наиболее подходящим кандидатом для ПКО или стандарта для количественного определения РНК-вирусов, поскольку устойчива к РНКазам, стабильная и неинфекционная. Такие конструкции можно получить при помощи бактериофагов, способных заражать бактерии (например, *Escherichia coli*). Полученная таким методом, инкапсулированная в ВПЧ РНК устойчива к расщеплению нуклеазами, стабильна при транспортировке и длительном хранении [1, 2].

Технология получения армированной РНК позволяет любой экзогенной РНК допустимого размера быть интегрированной через *pac*-участок генома бактериофага MS2 [3, 4]. Впоследствии такая армированная РНК может использоваться для диагностики вирусной РНК при помощи ОТ-ПЦР, в качестве положительного контроля и стандарта.

Мы в своей работе планируем опираться на технологию упаковки армированной РНК с помощью двух плазмид (см. рисунок). На одном плазмидном векторе — гены матуразы и белка оболочки, из второго будет транскрибироваться целевая РНК-последовательность вместе с *pac*-сайтом, способствующим упаковке целевого фрагмента РНК в оболочку фага MS2 [5]. Для увеличения стабильности структуры и повышения аффинности белка оболочки фага MS2 к целевому фрагменту РНК ВИЧ будет использоваться сайт *pac* с модификацией U-5 на C-5 [2]. Присутствие матуразы обеспечивает защиту целостности РНК от рибонуклеаз, а также взаимодействует с РНК, обеспечивает стабилизацию структуры [4]. Котрансформация плазмид будет происходить в штамме *E. coli* BL21. Запуск экспрессии промотором T7 реализуется добавлением ИПТГ (изопропил β-d-1-тиогалактопиранозида) в культуру клеток [6]. Даная система упаковки позволит получать только целевые последовательности РНК без частей генома MS2.

Целью работы является разработка векторных конструкций для эффективной наработки армированных РНК, применимых в диагностике ВИЧ. Планируется, что после успешной упаковки целевого фрагмента

© И. А. Смирнова, Г. В. Тымбур, Е. В. Расторгуева, Д. А. Викторов, 2025

РНК ВИЧ в капсид фага MS2 данная система будет использоваться для изготовления стабильных РНК ПКО для ОТ-ПЦР-тест-систем для выявления РНК ВИЧ.

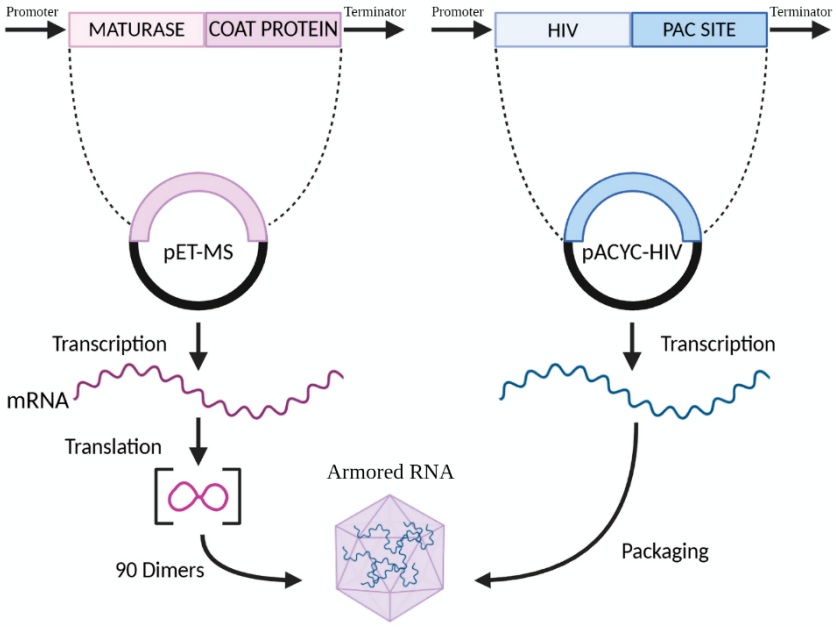


Схема получения армированной РНК с использованием двуплазмидной системы упаковки (создано в BioRender)

Литература

1. Eveleigh D., Lloyd M., Hui F. Using Armored RNA®/DNA as reliable molecular controls in infectious disease testing and beyond // Clinical Virology Symposium. Asuragen, Inc., Austin, TX. 2019.

2. Naskalska A., Heddle J. G. Virus-like particles derived from bacteriophage MS2 as antigen scaffolds and RNA protective shells // Nanomedicine (Lond.). 2024. Vol. 19, No. 12. P. 1103–1115.

3. Crone M. A., Freemont P. S. Simple low-cost production of DNA MS2 virus-like particles as molecular diagnostic controls // GEN Biotechnology. 2022. Vol. 1 (6). P. 496–503.

4. Gholami M. et al. Preparation and evaluation of ribonuclease-resistant viral HIV RNA standards based on armored RNA technology // Iranian Biomedical Journal. 2018. Vol. 22 (6). P. 394–400.

5. Mikel P. et al. Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens // Food and Environmental Virology. 2015. Vol. 7 (2). P. 96–111.

6. Gholami M. et al. Design and development of a quantitative TaqMan real-time PCR assay for evaluation of HIV-1 (group M) viral load in plasma using armored RNA standard // Clin. Lab. 2018. Vol. 64 (6). P. 955–963.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-131

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА НАПИТКА С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ ЗАКВАСКИ

DEVELOPMENT OF A BEVERAGE TECHNOLOGY WITH PROBIOTIC PROPERTIES BASED ON MULTI-COMPONENT STARTER CULTURE

И. Р. Соколов[1], М. С. Каночкина[1,2]

[1]*Российский биотехнологический университет, Москва*
[2]*ООО «Микробные нутриенты иммунокорректоры», Москва*

I. R. Sokolov[1], M. S. Kanochkina[1,2]

[1]*Russian Biotechnological University, Moscow*
[2]*Microbial Nutrients Immunocorrectors LLC, Moscow*

✉ radek.sokolov1@yandex.ru

Аннотация

В данном исследовании представлены результаты экспериментальной работы по разработке технологии производства обогащенных пробиотических напитков на основе многокомпонентной закваски молочнокислых бактерий. Проведен отбор пробиотических штаммов микроорганизмов различных видов и создана многокомпонентная закваска: *Lactococcus lactis* ssp. l*actis* № 41 — 60 %, *Lactobacillus helveticus* № 41 — 15 %, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* № 22 — 25 %.

Abstract

This study presents the results of experimental work on the development of technology for the production of enriched probiotic beverages based on multi-component starter culture. Selection of probiotic strains of microorganisms of various species and a multi-component starter culture has been created: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* № 41 — 60 %, *Lactobacillus helveticus* № 41 — 15 %, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* № 22 — 25 %.

Введение

COVID-19 и новые штаммы гриппа вызывают у многих пациентов желудочно-кишечные расстройства и дефицит микроэлементов, таких как магний и калий. Исследования 2022 и 2023 гг. подчеркивают важность нутритивной поддержки в этих условиях. Использование отходов какао для создания синбиотических напитков помогает сократить пищевые отходы и поддерживать экологию, а также расширить ассортимент функциональных продуктов.

Цель — разработка технологии приготовления напитка с пробиотическими свойствами на основе многокомпонентной закваски и отходов производств кондитерской промышленности.

Задачи исследования:

1) осуществить скрининг пробиотических микроорганизмов, способных активно накапливать биомассу в присутствии пребиотического компонента и разработанных сенсорных профилей, оценить их выживаемость;

2) разработать многокомпонентную закваску на основе молочнокислых бактерий;

3) разработать технологию производства пробиотического напитка на базе отходов переработки какао.

Материалы

В данной работе использовались штаммы микроорганизмов из коллекции кафедры биотехнологии и биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ»: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* № 241, *Lactobacillus helveticus* № 41, *Lactococcus lactis* ssp. cremoris № 22.

Методы

Анализ синергического взаимодействия между штаммами микроорганизмов. Молоко стерилизуется и инокулируется культурами микроорганизмов для оценки скорости образования сгустка. Пробирки проверяются каждые 4 ч, и сгусток анализируется с помощью методов Грама, титриметрии кислотности, определения активного pH среды и степени синерезиса.

© И. Р. Соколов, М. С. Каночкина, 2025

Метод идентификации MALDI Biotyper позволяет быстро определить вид микроорганизма по спектрам рибосомальных белков с использованием масс-спектрометрии. Колонии наносятся на металлическую мишень, покрываются матрицей для анализа, после сравнения результатов с базой данных устанавливается вид микроорганизма.

Титриметрическое определение кислотности. Образец ферментированного молока смешивается с водой и титруется раствором гидроксида натрия до pH 8,3 единицы. Расчеты титруемой кислотности проводятся по формуле, основанной на объеме использованного гидроксида натрия и массе образца.

Определение степени синерезиса. Синерезис оценивается с использованием фильтрационного метода, при котором измеряется количество отделенной сыворотки из образца. Фильтрование длится 5 ч.

Результаты и обсуждение

Выбранные штаммы прошли проверку качества с использованием вышеописанных методик. Результаты тестов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Время	***Lactococcus lactis* ssp *lactis* № 241**	***Lactobacillus helveticus* № 41**	***Lactococcus lactis* ssp *cremoris* № 22**
Кое/г			
1 сут	$6 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^5$
3 сут	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^8$
14 сут	$7 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^7$
21 сут	$9 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$
pH			
1 сут	6,2	6,2	6,5
3 сут	5,6	5,7	5,9
14 сут	5,3	5,2	5,3
21 сут	4,8	4,6	4,9
Титруемая кислотность			
1 сут	26	28	20
3 сут	48	46	44
14 сут	53	55	54
21 сут	70	73	65
Степень синерезиса			
1 сут	1,00 %	1,00 %	1 %
3 сут	1,28 %	1,45 %	1,32 %
14 сут	2,00 %	3,00 %	1,55 %
21 сут	10,00 %	20,00 %	8 %

В процессе исследования было создано 13 экспериментальных образцов многокомпонентных заквасок (табл. 2). Анализ результатов показал, что изменение содержания отдельных культур свыше 40 % в составе закваски значительно влияет на свойства конечного продукта.

Таблица 2

Разработка рецептуры образцов многокомпонентной закваски

Образец	**Концентрация каждого компонента закваски, %**			**Количество активной биомассы, КОЕ/г на 3 сут**
	***Lactococcus lactis* ssp. *lactis* № 241**	***Lactobacillus helveticus* № 41**	***Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* № 22**	
1	25,00	25,00	50,00	$6 \cdot 10^8$
2	25,00	50,00	25,00	$8 \cdot 10^8$
3	50,00	25,00	25,00	$6 \cdot 10^8$
4	33,00	33,00	33,00	$8 \cdot 10^8$
5	75,00	12,50	12,50	$9 \cdot 10^8$

Окончание табл. 2

Образец	Концентрация каждого компонента закваски, %			Количество активной биомассы, КОЕ/г на 3 сут
	Lactococcus lactis ssp. *lactis* № 241	*Lactobacillus helveticus* № 41	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* № 22	
6	12,50	75,00	12,50	$8 \cdot 10^8$
7	12,50	12,50	75,00	$6 \cdot 10^8$
8	60,00	20,00	20,00	$1 \cdot 10^9$
9	60,00	15,00	25,00	$1 \cdot 10^9$
10	60,00	25,00	15,00	$8 \cdot 10^8$
11	70,00	15,00	15,00	$2 \cdot 10^9$
12	70,00	20,00	10,00	$1 \cdot 10^9$
13	70,00	10,00	20,00	$1 \cdot 10^9$

Дополнительно была проведена органолептическая оценка качества продуктов, полученных с использованием данных заквасок, группой специалистов. Отобрана рецептура с наилучшими микробиологическими, технологическими и органолептическими характеристиками для дальнейшего использования: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* № 241 — 60 %; *Lactobacillus helveticus* № 41 — 15 %; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* № 22 — 25 %.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-132

СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ОЧИСТКИ СТОКОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛОВОГО СПИРТА *

MODERN METHODS OF WASTEWATER TREATMENT IN THE TECHNOLOGY OF OBTAINING ETHYL ALCOHOL

А. О. Соловьев, В. Д. Никитенко, Н. А. Вакуловская, А. А. Голубев, Э. Р. Нугаев

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии — филиал ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва

A. O. Solovyov, V. D. Nikitenko, N. A. Vakulovskaya, A. A. Golubev, Je. R. Nugaev

Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology — branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow

✉ lab78@mail.ru

Аннотация

В работе проведен анализ стоков, которые образуются в процессах переработки зернового сырья при получении этилового спирта. Особое внимание уделено конденсату от вакуум-выпарной установки и лютерной воде из-за большого объема и наличия потенциала для повторного использования. Рассмотрены перспективы очистки данных стоков при помощи современных методов: ультрафильтрации и озонирования.

Abstract

The paper analyzes the wastewater generated during grain processing to produce ethyl alcohol. Particular attention is paid to the condensate from the vacuum evaporation unit and luther water, due to their large volume and potential for reuse. The prospects for cleaning these wastewaters using modern methods are considered: ultrafiltration and ozonation.

Для проведения исследований с действующего завода по производству спирта этилового ректификованного были получены образцы конденсата с вакуум-выпарной установки (ВВУ) из цеха сушки барды и лютерной воды из цеха ректификации. Полученные образцы представляют собой прозрачную жидкость с характерным запахом, без посторонних видимых включений. Среды характеризуются кислым pH и высоким показателем химического потребления кислорода (ХПК), их недопустимо утилизировать как бытовые стоки. В образцах были определены ключевые химические показатели: pH, титруемая кислотность и ХПК, которые составили для конденсата ВВУ 3,44 ± 0,13 ед., 0,08 ± 0,02°, 1100 ± 66 мг O_2/дм^3 и для лютерной воды 3,93 ± 0,16 ед., 0,03 ± 0,01°, 800 ± 43 мг O_2/дм^3 соответственно. Это доказывает, что данные стоки должны быть классифицированы как производственные и подвергаться дополнительной очистке перед их утилизацией [1].

В то же время эти среды имеют потенциал для повторного использования в технологических или технических целях, что существенно уменьшает количество производственных стоков. Это позволит снизить экологическую нагрузку на окружающую среду, а также уменьшить эксплуатационные расходы на утилизацию стоков [2].

В качестве способов очистки производственных стоков были выбраны ультрафильтрация и озонирование. Эти способы отличаются своей доступностью и имеется опыт их применения на очистных сооружениях хозяйственно-бытового сектора. При этом их использование в промышленном секторе ограничено. Это ограничение связано с возможностями мембран при ультрафильтрации и специфичностью озонирования. Однако, с учетом отсутствия взвешенных частиц, рассматриваемые среды удовлетворяют всем требованиям для применения этих методов.

На рисунке изображена схема ультрафильтрации конденсата ВВУ и лютерной воды.

Схема подразумевает ступенчатую фильтрацию. Мембрана УПМ-100 обладает самыми крупными порами и выступает в роли фильтра грубой очистки. Ее назначение — минимизация негативного влияния крупных примесей на последующую, более тонкую, степень фильтрации. Поэтому влияние первой ступени фильтрации на показатель ХПК не значительно.

Применение мембраныУПМ-10 позволяет снизить ХПК в пермеате лютерной воды на 8 %, а в пермеате конденсата ВВУ на 60 %. Тем не менее уровень ХПК в исследуемых средах все равно остается на уровне, превы-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № FGMF-2025-0012.

© А. О. Соловьев, В. Д. Никитенко, Н. А. Вакуловская, А. А. Голубев, Э. Р. Нугаев, 2025

шающем допустимый для возможности их сброса в окружающую среду или использования в качестве технической воды.

Обратноосмотическая мембрана XLE способствует снижению ХПК конденсата ВВУ на 78 %, а лютерной воды на 73 %. Данные показатели уже допускают применение рассматриваемых стоков для технологических или технических целей, например для приготовления CIP-растворов, хозяйственно-бытовых нужд.

Для снижения показателя ХПК при помощи озонирования исследуемые образцы помещали в колбу Эрленмейера объемом 500 мл, которая сообщается с атмосферой через гидрозатвор, после чего насыщали их озоном при помощи лабораторного генератора озона (озонатора) в течение 120 мин. При этом pH образцов предварительно приводили к значению 6,00 ± 0,05 ед., так как при данном pH наблюдается наилучшая растворимость озона в жидких средах.

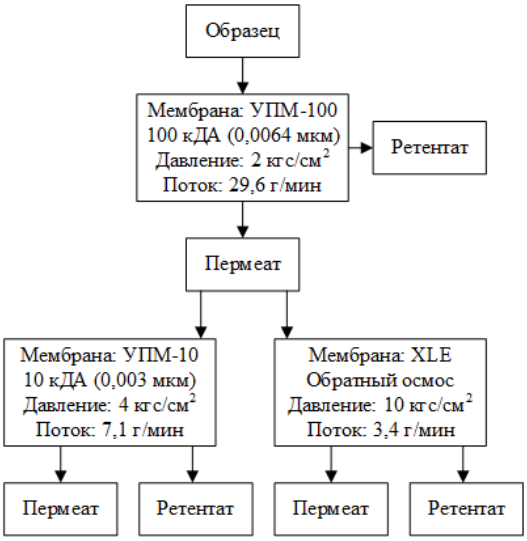


Схема ультрафильтрации образцов

Поскольку озон является сильным окислителем, после его воздействия в образцах контролировали ХПК, pH, ионный состав и состав органических кислот [3]. Выявлено, что воздействие озоном способствует снижению pH на 50 % и более, то есть до значений ниже, чем в исходных образцах. ХПК при этом снижается на 33 % в конденсате ВВУ и на 40 % в лютерной воде. Во всех образцах наблюдается значительное увеличение концентрации щавелевой, винной и уксусной кислоты, а также нитрат-ионов. Это явление связано с окислительными свойствами озона, которые при взаимодействии с органическими веществами исследуемых образцов вступают с ними в реакцию.

Таким образом, применение ультрафильтрации для очистки сточных вод спиртового производства допустимо и позволяет применять очищенную воду для технологических и технических нужд. Применение озонирования для снижения ХПК исследуемых образцов показало меньшую эффективность, но тем не менее позволяет значительно снизить данный показатель.

Литература

1. Постановление Правительства РФ от 31.12.2020 № 2398 (ред. от 18.12.2024) «Об утверждении критериев отнесения объектов, оказывающих негативное воздействие на окружающую среду, к объектам I, II, III и IV категорий» // КонсультантПлюс. URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_373399/ (дата обращения 18.06.2025).

2. Абрамова И. М, Туршатов М. В., Кривченко В. А. и др. Биоконверсия растительного сырья в этиловый спирт и кормопродукты по замкнутому циклу // Биотехнология. 2021. Т. 37, № 4. С. 106–111.

3. Теречик Л. Ф. Очистка сточных вод спиртовых заводов. 1. Использование озонирования для биологической очистки сточных вод, насыщенных бардой. (Испания) // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. 2002. № 3. С. 804.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-133

БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ТРУДНОРАСТВОРИМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НЕОДИМА МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ КОНТАКТНЫМ МЕТОДОМ

BIOLEACHING OF POORLY SOLUBLE NEODYMIUM COMPOUNDS BY MICROSCOPIC FUNGI BY CONTACT METHOD

Н. А. Сороколетова[1,2], Е. И. Серебров[1,2], С. Н. Беляев[2], Д. В. Белов[2]

[1]Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
[2]Институт прикладной физики им. А. В. Гапонова-Грехова РАН, Нижний Новгород

N. A. Sorokoletova[1,2], E. I. Serebrov[1,2], S. N. Belyaev[2], D. V. Belov[2]

[1]Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
[2]A. V. Gaponov-Grekhov Institute of Applied Physics RAS, Nizhny Novgorod

✉ n.sorokoletova@ipfran.ru

Аннотация

В работе показана возможность эффективного извлечения неодима из его оксида в растворимую форму выщелачиванием посредством прямого контакта с микромицетами. Результаты работы помогут раскрыть потенциал микромицетов для применения в экологически чистой технологии извлечения редкоземельных элементов. Это может послужить основанием для разработки экологичной альтернативы применяемым методам, использующим неорганические кислоты и токсичные вещества.

Abstract

The study demonstrates the possibility of efficient extraction of neodymium from its oxide into a soluble form by leaching through direct contact with micromycetes. The results of the paper will help to reveal the potential of micromycetes for use in environmentally friendly technology for extracting rare earth elements. This may serve as a basis for developing an environmentally friendly alternative to the methods used using inorganic acids and toxic substances.

Редкоземельные элементы (РЗЭ) широко используются во всех современных отраслях промышленности, включая оборонную. Они являются ценным стратегическим ресурсом. Хотя РЗЭ присутствуют в земной коре в достаточном количестве, доля их извлечения гораздо меньше по сравнению с другими металлами. В то же время отходы электронной промышленности, содержащие значительное количество редкоземельных металлов, являются одними из самых быстрорастущих.

В отличие от гидрометаллургического пути извлечения РЗЭ из их труднорастворимых соединений, технология биовыщелачивания является более щадящей для окружающей среды. Широко известно бактериальное биовыщелачивание, по сравнению с ним биовыщелачивание микромицетами имеет ряд преимуществ: микромицеты способны расти в широком диапазоне значений pH, приспосабливаются к условиям с повышенным содержанием ионов тяжелых металлов, токсичных соединений, для их жизнедеятельности достаточно недорогих органических субстратов.

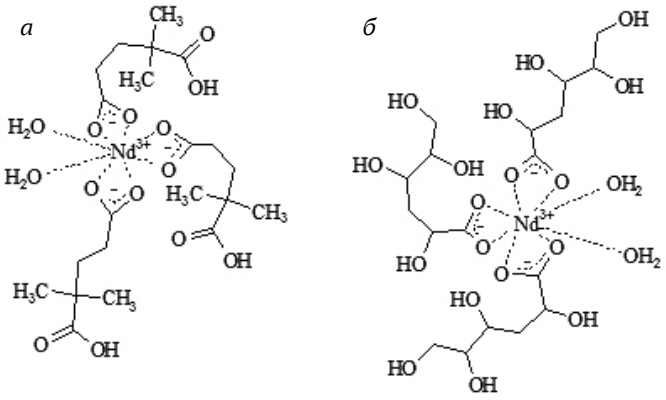
В данной работе изучали биовыщелачивание неодима из его оксида Nd_2O_3 методом прямого контакта микроскопическими грибами *Aspergillus niger*. Их способность к извлечению катионов металлов связана с продуцированием органических кислот в результате жизнедеятельности. Для проведения экспериментов по биовыщелачиванию на дно стерильных чашек Петри помещали навеску оксида неодима Nd_2O_3 и заливали стерильную и охлажденную до 50 °C среду Чапека — Докса. Концентрация Nd_2O_3 составляла 100 мг/л. Стерильную питательную среду с порошком Nd_2O_3 тщательно перемешивали для равномерного распределения частиц по объему. Чашки с застывшей питательной средой термостатировали 3 сут, после чего инокулировали культурой *A. niger*. Инкубацию проводили при температуре 27 ± 2 °C в течение 6 мес до полного истощения питательной среды. Сравнение проводили с контрольными чашками, которые оставались стерильными и инкубировались также в течение 6 мес, в которых частицы оксида неодима на плотной питательной среде оставались без изменений [1].

Для подтверждения гипотезы о накоплении РЗЭ клетками микромицета навеску 2 г сухого остатка биомассы микромицета *A. niger* без питательной среды после процесса биовыщелачивания озоляли в высокотемпера-

© Н. А. Сороколетова, Е. И. Серебров, С. Н. Беляев, Д. В. Белов, 2025

турной печи (550 °С, 3 ч), затем к золе прилили 5 мл азотной кислоты (63 %) и упарили раствор до объема пробы 1 мл. Полученную пробу растворили в бидистиллированной воде и проанализировали спектрометрическим методом на наличие неодима. Результаты показали, что содержание Nd^{3+} в мицелии *A. niger* составило 40 % от начальной концентрации Nd_2O_3 в питательной среде.

Для изучения подтверждения нахождения ионов Nd^{3+} в растворенном виде в питательной среде и исследования выщелачивающих метаболитов микромицета провели экстракцию. Высохшую питательную среду с остатками культуры микромицетов (мицелий и споры) измельчили и непрерывно экстрагировали в аппарате Сокслета в течение 1 ч. Экстрагентами послужили этиловый (96 масс.%) и изопропиловый спирты. Для отделения остатков клеток и спор микромицетов полученные экстракты светло-желтого цвета были дважды профильтрованы через мембранный фильтр для микрофильтрации.



Предполагаемые структуры комплексных соединений неодима с 3-дезокси-*D*-манноновой (*а*) и 2,2-диметилглутаровой (*б*) кислотами

С помощью рентгенофлуоресцентного анализа установили наличие ионов Nd^{3+} в экстракте питательной среды. Предполагается, что ионы РЗЭ диффундируют в среду в виде соединений с органическими кислотами и хелаторами, продуцируемыми микромицетом в процессе жизнедеятельности. Для исследования выщелачивающих метаболитов было проведено исследование экстракта мицелия на хромато-масс-спектрометре. По результатам исследований был идентифицирован ряд агентов, способных к реакции с оксидом неодима в питательной среде и хелатированию ионов Nd^{3+}: 2,2-диметилглутаровая кислота, фенилмалоновая кислота, 2-дезокси-*D*-эритропентоза, пальмитиновая кислота, олеиновая кислота, стеариновая кислота. На рисунке приведены предполагаемые структуры комплексных соединений неодима с 3-дезокси-*D*-манноновой (*а*) и 2,2-диметилглутаровой (*б*) кислотами, являющимися метаболитами микромицета *A. niger*.

Литература

1. Belov D. V., Belyaev S. N., Razov E. N. et. al. Green strategy for bioleaching of poorly soluble neodymium compounds by microscopic fungi // Applied Biochemistry and Microbiology. 2025. Vol. 61 (4). P. 762–777.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-134

ЭКЗОМЕТАБОЛОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТРАДИЦИОННЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ АНАЛИЗА БОЛЬШИХ ДАННЫХ

EXOMETABOLOMIC STUDY OF NOVEL YEAST STRAINS ISOLATED FROM TRADITIONAL FERMENTED FOODS USING BIG-DATA ANALYTICAL METHODS

М. А. Сотникова[1–4], А. Ю. Лысенко[1], А. А. Степанова[1], В. В. Толкачева[1], А. В. Адамовская[5], Н. В. Басов[1–3], А. Н. Иркитова[6], А. Д. Рогачев[2,3], Е. В. Гайслер[2], А. Г. Покровский[2], В. А. Иванисенко[2,5], Д. Н. Щербаков[6]

[1]Специализированный учебно-научный центр НГУ, Новосибирск
[2]Новосибирский государственный университет
[3]Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
[4]НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[5]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[6]Алтайский государственный университет, Барнаул

M. A. Sotnikova[1–4], A. Yu. Lysenko[1], A. A. Stepanova[1], V. V. Tolkacheva[1], A. V. Adamovskaya[5], N. V. Basov[1–3], A. N. Irkitova[6], A. D. Rogachev[2,3], E. V. Gaisler[2], A. G. Pokrovsky[2], V. A. Ivanisenko[2,5], D. N. Shcherbakov[6]

[1]Specialized Educational Scientific Center NSU, Novosibirsk
[2]Novosibirsk State University
[3]N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS
[4]Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk
[5]Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk
[6]Altai State University, Barnaul

✉ m.sotnikova1@g.nsu.ru

Аннотация

Работа демонстрирует потенциал применения экзометаболомного скрининга (скрининга внеклеточных метаболитов) методом ВЭЖХ-МС/МС в исследовании дрожжевых штаммов и отборе перспективных продуцентов биотехнологически ценных соединений.

Abstract

The work suggests that exometabolomic screening (the screening of extracellular metabolites) using LC-MS/MS has potential applications in the study of yeast strains and the selection of promising producers of biotechnologically valuable compounds.

Передовые методы метаболомного анализа, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС), предоставляют уникальные возможности для изучения микроорганизмов посредством анализа низкомолекулярных метаболитов, секретируемых в культуральную среду. Среди них особое значение имеет экзометаболомный скрининг — анализ внеклеточных метаболитов, являющийся перспективным подходом при оценке биосинтетического потенциала микроорганизмов. Данный подход особенно полезен при исследовании новых природных штаммов.

Целью данного исследования было комплексное изучение метаболических особенностей дрожжевых штаммов, выделенных из традиционных ферментированных продуктов (кумыс, медовуха, кефирный гриб), с применением экзометаболомного скрининга в сочетании с многомерной статистикой и исследовательским анализом данных, а также идентификация белков, ответственных за наблюдаемые различия в экзометаболомных профилях. В качестве объектов исследования выступили дрожжевые штаммы, полученные из образцов, собранных в Казахстане и Кыргызстане, с использованием штамма *Kluyveromyces lactis* в качестве контрольного. Пробоподготовка образцов культуральных сред осуществлялась по оригинальному протоколу, включающему осаждение белков 100%-м изопропанолом, что обеспечило высокое метаболомное покрытие. Метаболомный скрининг проводил-

© М. А. Сотникова, А. Ю. Лысенко, А. А. Степанова, В. В. Толкачева, А. В. Адамовская, Н. В. Басов, А. Н. Иркитова, А. Д. Рогачев, Е. В. Гайслер, А. Г. Покровский, В. А. Иванисенко, Д. Н. Щербаков, 2025

ся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) в соответствии с ранее разработанной методикой [1, 2].

Полученные данные обрабатывались с использованием комплекса статистических методов, включая нормализацию, построение тепловых карт, анализ главных компонент (PCA), частичный дискриминантный анализ (PLS-DA), непараметрические статистические тесты и анализ перепредставленности метаболических путей.

В результате анализа были получены данные об относительном содержании 336 метаболитов в культуральных средах исследуемых штаммов. Методологический подход выявил значимые различия в метаболомном профиле двух природных штаммов по сравнению с контрольным штаммом *Kluyveromyces lactis*. Для данных штаммов были обнаружены характерные сдвиги в биосинтезе азотистых оснований, метаболизме аминокислот и углеводов, что может свидетельствовать об особых адаптационных механизмах и биотехнологическом потенциале. Полученные результаты подтвердились с помощью PCA и визуализации тепловых карт, которые отразили формирование специфических метаболомных кластеров, характерных для отдельных штаммов.

С использованием базы данных KEGG были выявлены перепредставленные метаболические пути, демонстрирующие различия в экспрессии метаболитов между штаммами. Применение инструмента ANDSystem [3] позволило реконструировать сети белок-белковых взаимодействий для всех ферментов, участвующих в этих метаболических путях. Полученные данные демонстрируют устойчивые различия в экспрессии ферментов и регуляторных белков у природных дрожжевых штаммов кумыса по сравнению с лабораторным штаммом *Kluyveromyces lactis*. Были идентифицированы потенциальные белки-мишени, воздействие на которые может приводить к изменению экспрессии метаболитов — участников перепредставленных путей. Анализ биологических процессов показал, что ключевыми процессами, связанными с наблюдаемыми различиями в экспрессии белков, являются защита клетки и генома, регуляция биосинтеза белков и деление клеток.

Таким образом, комбинация экзометаболомного скрининга и инструментов исследовательского анализа данных позволяет эффективно оценивать биосинтетический потенциал дрожжевых штаммов. Данный подход перспективен для широкого применения в оценке биотехнологического потенциала природных микроорганизмов в промышленных масштабах.

Литература

1. Басов Н. В., Рогачев А. Д. и др. Исследование хроматографического поведения метаболитов из плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола // Химия в интересах устойчивого развития. 2022. Т. 30 (6). С. 591–598.

2. Basov N. V., Rogachev A. D. et al. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole // Talanta. 2024. Vol. 267. P. 125168.

3. Ivanisenko V. A. et al. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology // BMC systems biology. 2015. Vol. 9. Suppl. 2. P. S2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-135

МОРСКОЙ ГРИБ *TRICHODERMA KONINGII* КММ 4751 — ИСТОЧНИК СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ*

MARINE FUNGI *TRICHODERMA KONINGII* KMM 4751 IS A SOURCE OF COMPOUNDS WITH ANTITUMOR POTENTIAL

С. С. Старновская, А. Н. Юрченко, Ю. В. Худякова, Е. С. Менчинская, Е. А. Юрченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

S. S. Starnovskaya, A. N. Yurchenko, Y. V. Khudyakova, E. S. Menchinskaya, E. A. Yurchenko

G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok

✉ starnovskaya_ss@piboc.dvo.ru

Аннотация

Из морского гриба *Trichoderma koningi* КММ 4751 получен биоактивный метаболит 3-этил-4-гидрокси-6-метил-2Н-пиран-2-он (ЭГМП). Подобраны оптимальные условия культивирования. Выделенный ЭГМП демонстрирует цитотоксическое и противоопухолевое действие на клетки рака молочной железы линии MCF-7, включая снижение миграции и образования сфероидов. Гриб является перспективным источником биологически активных соединений.

Abstract

The bioactive metabolite 3-ethyl-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one (EHMP) was isolated from the marine fungus *Trichoderma koningi* KMM 4751. The optimal cultivation conditions have been selected. The isolated EHMP demonstrated cytotoxic and antitumor effects on the MCF-7 breast cancer cells, including reduced migration and spheroids formation. The fungus is a promising source of biologically active compounds.

Штамм морского гриба КММ 4751 был выделен из дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* и идентифицирован как *Trichoderma koningi* по морфологическим признакам. Было проведено аналитическое культивирование этого гриба с целью выбора как наиболее подходящей питательной среды, так и оптимального времени культивирования. Исследовали состав вторичных метаболитов экстрактов, полученных после культивирования на рисовой среде, агаре с солодовым экстрактом (MEA) и агаризованном сусле в течение 14 и 21 дня

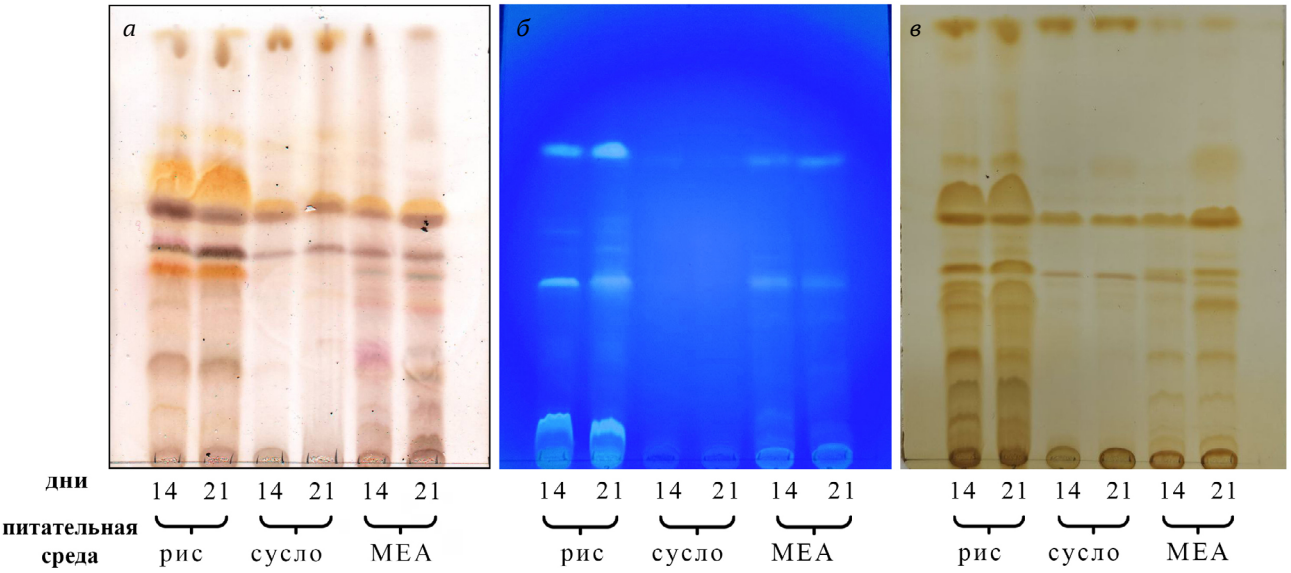


Рис. 1. ТСХ различных экстрактов морского гриба *Trichoderma koningi* КММ 4751, которые проявляли спиртовым раствором серной кислоты (*а*), при 395 нм (*б*) и парами йода (*в*)

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-73-20049).

© С. С. Старновская, А. Н. Юрченко, Ю. В. Худякова, Е. С. Менчинская, Е. А. Юрченко, 2025

(рис. 1). Культивирование на рисовой среде приводило к большему выходу вторичных метаболитов. Качественный состав метаболитов на 21-й день культивирования практически не отличался от состава на 14-й день, при этом на 21-й день происходило увеличение общего выхода метаболитов — наибольшая масса экстракта была получена после 21-дневного культивирования на рисовой среде (см. таблицу).

Выход экстракта в зависимости от времени культивирования

Питательная среда	Время культивирования, дни	Количество экстракта на кг среды, мг/кг
Рис	14	$14{,}7 \times 10^{-4}$
	21	$20{,}54 \times 10^{-4}$
Агаризованное сусло	14	$2{,}35 \times 10^{-4}$
	21	$1{,}3 \times 10^{-4}$
Агар с солодовым экстрактом (MEA)	14	$0{,}8 \times 10^{-4}$
	21	$1{,}6 \times 10^{-4}$

Таким образом, для выделения индивидуальных соединений гриб культивировали в течение 21 дня на твердой рисовой среде. Этилацетатный экстракт подвергали многократной колоночной хроматографии на силикагеле, а затем обращенно-фазовой ВЭЖХ для получения индивидуального 3-этил-4-гидрокси-6-метил-2H-пиран-2-она (ЭГМП) (рис. 2).

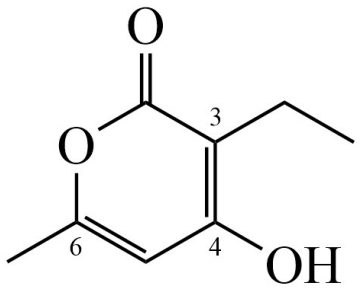


Рис. 2. Химическая структура 3-этил-4-гидрокси-6-метил-2H-пиран-2-она (ЭГМП)

ЭГМП специфично снижал жизнеспособность клеток рака молочной железы линии MCF-7 по сравнению с клетками нормального эпителия молочной железы линии MCF-10A в концентрациях 1–10 мкМ. Также было отмечено ингибирующее влияние ЭГМП на образование колоний клеток MCF-7 и их миграцию, арест клеточного цикла и индукция апоптоза. Для того чтобы выяснить, вовлечены ли эстрогеновые рецепторы (ЭР) в действие ЭГМП на эстроген-зависимые клетки линии MCF-7, был использован антагонист ЭР 4-гидрокситамоксифен. Было установлено, что превентивное применение 4-гидрокситамоксифена существенно снижает цитотоксическое действие ЭГМП.

Противоопухолевое действие ЭГМП было исследовано в 3D-культуре клеток линии MCF-7, когда клетки образуют объемные формирования, называемые сфероидами. Таким образом более эффективно моделируется взаимодействие клеток друг с другом, что более полно имитирует опухоль. ЭГМП в концентрациях 10 и 20 мкМ уменьшал площадь сфероидов MCF-7 на 40–50 % по сравнению с контрольными, что подтверждает его противоопухолевый потенциал.

ЭГМП продуцируется грибом *Trichoderma koningi* КММ 4751 с выходом 12,79 мг/г сухого экстракта или 2,15 мг/кг среды. В связи с этим мы считаем гриб *T. koningi* КММ 4751 перспективным продуцентом ценного с точки зрения биологической активности соединения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-136

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПИРОФОСФОГИДРОЛАЗЫ И РНК-ЛИГАЗЫ 1 ДЛЯ СИНТЕЗА КОЛЬЦЕВЫХ РНК

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR PRODUCING RECOMBINANT PYROPHOSPHOHYDROLASE AND RNA LIGASE 1 FOR CIRCULAR RNA SYNTHESIS

А. А. Сульгин, А. А. Вольных, Л. И. Карпенко

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

A. A. Sulgin, A. A. Volnyh, L. I. Karpenko

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ sulgin.alexander@yandex.ru

Аннотация

В представленной работе был разработан метод получения рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы и Т4 РНК-лигазы 1, необходимых для ферментативного синтеза кольцевых РНК *in vitro*. Была проведена оптимизация температурных условий культивирования и очистки рекомбинантных ферментов. Полученные ферменты имели высокую степень чистоты и сохраняли активность в течение длительного времени.

Abstract

In this study, a method was developed for the production of recombinant enzymes—pyrophosphohydrolase and T4 RNA ligase 1 — required for the enzymatic synthesis of circular RNAs in vitro. Cultivation and purification conditions were optimized to improve enzyme solubility and yield. The purified enzymes exhibited high purity and retained their activity over an extended storage period.

В настоящее время технологии РНК активно исследуются в качестве платформы для разработки средств профилактики инфекционных заболеваний. Перспективным направлением является использование кольцевых РНК. Преимуществом данной платформы по сравнению с линейной мРНК является повышенная стабильность молекулы, за счет которой достигается более продолжительная экспрессия белка, отсутствие необходимости в дополнительных модификациях нуклеотидной последовательности, а также способность кольцевых РНК активировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ.

Одним из методов получения кольцевых РНК является лигирование линейной РНК ферментативным методом. Первым этапом в данном методе получения кРНК является синтез линейного предшественника путем транскрипции *in vitro*. Получившийся линейный предшественник имеет три фосфатные группы на 5′-конце, поэтому не подходит для прямого лигирования. Одним из способов удаления фосфатных групп является дефосфорилирование пирофосфогидролазой (RppH), которая удаляет пирофосфат, оставляя одну фосфатную группу на 5′-конце. При добавлении в реакционную смесь второго фермента — Т4 РНК-лигазы 1 — происходит образование фосфодиэфирной связи между 5′-фосфатом и 3′-гидроксильной группой РНК, что необходимо для замыкания молекулы в кольцо. Разработка рекомбинантных ферментов позволит удешевить и стандартизировать синтез кРНК, а также в дальнейшем масштабировать его для биомедицинских задач.

Получение рекомбинантных ферментов

Ген *rppH*, кодирующий пирофосфогидролазу, был амплифицирован из геномной ДНК *E. coli*, штамм K-12. Ген *rnlA*, кодирующий Т4 РНК-лигазу 1, получен путем синтеза *de novo* с оптимизацией кодонного состава. Клонирование целевых генов проводили в вектор pET-21a(+) (Novagen, Англия) по сайтам рестрикции NdeI и XhoI (Сибэнзим, Россия).

Полученные плазмиды pET-21a-RppH и pET-21a-RnlA, кодирующие RppH и Т4 РНК-лигазу 1, трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3). Индукцию проводили 1 мМ ИПТГ с последующей инкубацией при 16 °C в течение 20 ч, или при 25 °C в течение 6 ч, или при 37 °C в течение 4 ч.

Очистку рекомбинантных ферментов проводили с использованием сорбента Ni-NTA агарозы (Биоспецифика, Россия). Элюцию проводили в буфере, содержащем 20 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0,1 мМ EDTA, имидазол 500 мМ, pH 7,5 для RppH и RnlA. В дальнейшем проводили обессоливание с помощью Sephadex G-10

© А. А. Сульгин, А. А. Вольных, Л. И. Карпенко, 2025

(Pharmacia, Швеция) на оптимизированные буферы для хранения. Для длительного хранения при −20 °C в буфер добавляли 50 % глицерола по объему.

Результаты и обсуждение

Продукцию рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы и T4 РНК-лигазы 1 подтвердили методом электрофореза лизатов клеток штаммов-продуцентов *E. coli* BL21(DE3)/pET-21(a)-RppH и *E. coli* BL21(DE3)/pET-21(a)-RnlA в полиакриламидном геле. Поскольку ферменты предпочтительней выделять из растворимой фракции во избежание потери активности при рефолдинге, были подобраны температурные условия, при которых ферменты не уходили в нерастворимую фракцию.

В ходе экспериментов было обнаружено, что при культивировании при температуре 16 °C целевые белки переходят в растворимую фракцию, а при более высоких температурах — в тельца включения.

Рекомбинантные ферменты выделяли методом аффинной хроматографии. Элюцию проводили пошагово. Элюция целевых белков происходила преимущественно при концентрации имидазола от 120 до 200 мМ.

Для оценки чистоты и подтверждения молекулярной массы очищенных ферментов фракции после смены буфера анализировали методом электрофореза SDS-PAGE. Электрофоретический анализ очищенных ферментов показал соответствие молекулярного веса литературным данным: около 20 кДа для RppH и около 43 кДа для T4 РНК-лигазы 1. Чистота очищенных белков составляла более 90 %.

Ферменты были стабильны в течение 3 месяцев при хранении в буфере с глицеролом при −20 °C. Активность ферментов проверялась в модельных реакциях дефосфорилирования и лигирования РНК с использованием синтетических олигонуклеотидов, и соответствовала коммерческим аналогам.

Заключение

Разработанный метод получения рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы RppH и T4 РНК-лигазы 1 обеспечивает высокую степень чистоты и активность целевых белков, достаточную для использования в протоколах синтеза кольцевых РНК *in vitro*. Оптимизация условий экспрессии и очистки позволила избежать стадии рефолдинга.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-137

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ПОРОШКОВ ПЛОДОВ ЧЕРНОПЛОДНОЙ РЯБИНЫ И ЧЕРЕМУХИ *

STUDY OF PREBIOTIC POTENTIAL OF THE ETHANOL EXTRACTS FROM POWDERS OF CHOKEBERRY AND BIRD CHERRY FRUITS

Д. А. Тимкачев, О. Д. Корноухова, Н. Ю. Хромова, Б. А. Кареткин, В. И. Панфилов

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

D. A. Timkachev, O. D. Kornoukhova, N. Yu. Khromova, B. A. Karetkin, V. I. Panfilov

D. I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow

✉ khromova.n.i@muctr.ru

Аннотация

Поиск новых источников пребиотических соединений — важное условие для разработки эффективных синбиотиков. В работе приведены результаты оценки пребиотического потенциала этанольных экстрактов из порошков плодов черноплодной рябины и черемухи по отношению к лактобактериям. Показано, что эффект зависит не только от вида растительного сырья, но и является штамм-специфичным. Добавление в среды ягодных экстрактов стимулировало синтез органических кислот у штаммов *L. plantarum*.

Abstract

The search for new sources of prebiotic compounds is an important condition for the development of effective synbiotics. The paper presents the results of assessing the prebiotic potential of ethanol extracts from powders of chokeberry and bird cherry fruits in relation to lactobacilli. It is shown that the effect depends not only on the type of plant material but is also strain-specific. Addition of berry extracts to the media stimulated the synthesis of organic acids in *L. plantarum* strains.

В современном обществе в связи с неправильным питанием и стрессом крайне важно поддержание численности, состава и функциональной активности микробиоты кишечника, которая выполняет множество функций: от регулирования перистальтики до ингибирования роста патогенов [1]. Для ее восстановления используются такие средства, как пробиотики и пребиотики, в качестве последних чаще всего выступают биологически активные вещества (БАВ), в том числе полифенолы, содержащиеся в растениях. За счет антиоксидантного, противовоспалительного и иммуномодулирующего действия полифенолы являются перспективными объектами исследования [2]. Они могут положительно воздействовать на метаболизм полезных членов микробного сообщества, а также ингибировать рост патогенной микрофлоры [3].

Многообещающим источником полифенолов являются плоды черемухи и черноплодной рябины. Так, из ягод различных видов черемухи было выделено 15 БАВ фенольной природы, среди которых изокверцитрин, рутин, гиперин и т. д. [4]. Ягоды черноплодной рябины также богаты полифенолами и содержат до 2900 мг/100 г веществ с Р-витаминной активностью (катехамин, антоцианы, флавонолы) [5].

Целью настоящей работы являлась оценка пребиотического эффекта экстрактов из порошков плодов черноплодной рябины и черемухи, содержащих полифенолы.

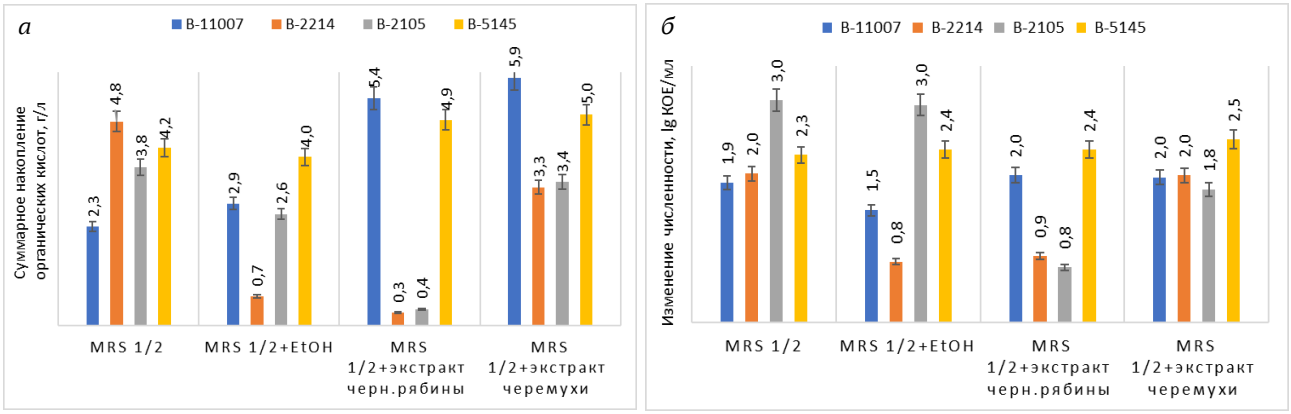
В качестве микробных объектов использовали штаммы *Lactobacillus plantarum* В-11007, В-5145, *L. acidophilus* В-2105 и *L. salivarius* В-2214, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (Россия).

Для определения пребиотического эффекта проводили культивирование лактобактерий в среде MRS половинного состава, с добавлением экстрактов ягод, полученных методом горячей экстракции 60%-м раствором этилового спирта в течение 2 ч с обратным холодильником. В качестве контрольных сред использовали среды MRS (½ состава) с добавлением этилового спирта в той же концентрации, что при экстракции, и без. Засев пробиотических культур осуществлялся с учетом оптической плотности (ОП). Значение ОП после инокуляции во всех образцах составляло 0,05 при 600 нм. Концентрации молочной и уксусной кислот определяли на хроматографе Agilent 1220 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA) с колонкой Agilent Hi-Plex H (250 × 4,6 мм) и рефрактометрической детекцией [6]. Содержание общих фенолов определяли с реактивом Фолина — Чокальтеу [7].

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-19-00298).

© Д. А. Тимкачев, О. Д. Корноухова, Н. Ю. Хромова, Б. А. Кареткин, В. И. Панфилов, 2025

О наличии пребиотического эффекта у экстрактов из ягодных порошков судили по разнице показателей роста культур в экспериментальных и контрольных средах после 18 ч культивирования при 37 °С. Результаты сравнительного анализа накопления органических кислот и изменения численности представлены на рисунке.



Накопление органических кислот (*а*) и изменение количества жизнеспособных клеток (*б*) после 18 ч культивирования

Установлено, что штаммы *L. plantarum* продемонстрировали более интенсивный синтез молочной и уксусной кислот в среде, содержащей ягодные экстракты (см. рисунок, *а*), но численность клеток значительно не различалась (см. рисунок, *б*). Наличие экстракта черноплодной рябины влияло на синтез кислот у штаммов В-2214 и В-2105, однако в среде, содержащей экстракт черемухи, такого влияния не наблюдали. Та же тенденция сохранялась при сравнении количества жизнеспособных клеток.

Таким образом, пребиотический эффект ягодных экстрактов не только зависит от вида растительного сырья, но также является штамм-специфическим, а также проявляется преимущественно в образовании органических кислот.

Литература

1. Ардатская М. Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микроэкологических нарушений кишечника // Медицинский совет. 2015. № 13. С. 94–99.

2. Бекбулатова Е. В., Зокирова М. С., Тадаева Е. В. Функциональные напитки нового поколения: исследования и перспективы использования флавоноидов в природе // Строительство и образование. 2024. Т. 3, № 4. С. 156–163.

3. Gibson G., Hutkins R., Sanders M. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2017. Vol. 14. P. 491–502.

4. Анциферов А. В. Биологически активные вещества черемухи // Лесные биологически активные ресурсы (березовый сок, живица, эфирные масла, пищевые, технические и лекарственные растения). 2004. С. 143–147.

5. Гребенев И. Р. Сравнительная оценка химического состава плодов и листьев аронии черноплодной // Биодиагностика состояния природных и природно техногенных систем: материалы XX Всероссийской научно практической конференции с международным участием, Киров, 1 декабря 2022 года. 2022. С. 324–327.

6. Scherer R. et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices // Food Chemistry. 2012. Vol. 135 (1). P. 150–154.

7. Singleton V. L., Rossi J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents // American Journal of Enology and Viticulture. 1965. Vol. 16 (3). P. 144–158.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-138

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСПЕНЗИОННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МАКЛЕЙИ СЕРДЦЕВИДНОЙ (*MACLEAYA CORDATA* (WILLD.) R. BR.)

EFFECT OF LIGHT ON GROWTH PARAMETERS AND BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF *MACLEAYA CORDATA* CELL SUSPENSION CULTURE *IN VITRO*

А. С. Тимохина, И. А. Лупанова

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва

A. S. Timokhina, I.A. Lupanova

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow

✉ mail.t.a.s.77777@mail.ru

Аннотация

Изучено влияние спектрального состава света на рост и биосинтетическую активность суспензионной культуры клеток *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. Селективный свет, особенно в красном спектре, имеет значительное влияние на ростовые характеристики и биосинтез вторичных метаболитов в клеточных культурах *M. cordata*. Максимальное накопление сухой биомассы составило *M* = 16,6 г/л.

Abstract

The effect of the light spectral composition on the growth and biosynthetic activity of *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. cell suspension culture was studied. Selective light, particularly in the red spectrum, significantly affects growth characteristics and secondary metabolites biosynthesis in M. cordata cell cultures. The maximum dry biomass accumulation reached M = 16.6 g/l.

Введение

На данный момент до 70 % лекарственных средств частично или полностью созданы на основе биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения. Для увеличения выхода целевых БАВ при переработке лекарственного растительного сырья необходимо либо увеличивать их концентрации в интактном растении, либо, альтернативно, использовать биотехнологические культуры клеток, тканей и органов высших растений в качестве альтернативного, экологически чистого возобновляемого сырья.

В связи с этим актуальной является регуляция биотехнологических процессов биосинтеза в растительных суспензионных культурах БАВ путем воздействия экзогенных факторов, в том числе путем влияния селективного света на ростовые характеристики, накопление вторичных метаболитов и их биологическую активность, в условиях культуры *in vitro*.

Перспективным объектом для проведения исследований по данной тематике является растение семейства Маковые (*Papaveraceae*) — маклейя сердцевидная (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.), которую можно рассматривать как модельный объект в целях получения целого спектра БАВ, в частности алкалоидов и полифенолов [1]. Извлечения маклейи сердцевидной обладают антимикробным, противовоспалительным, противоопухолевым действием [2].

Материалы и методы

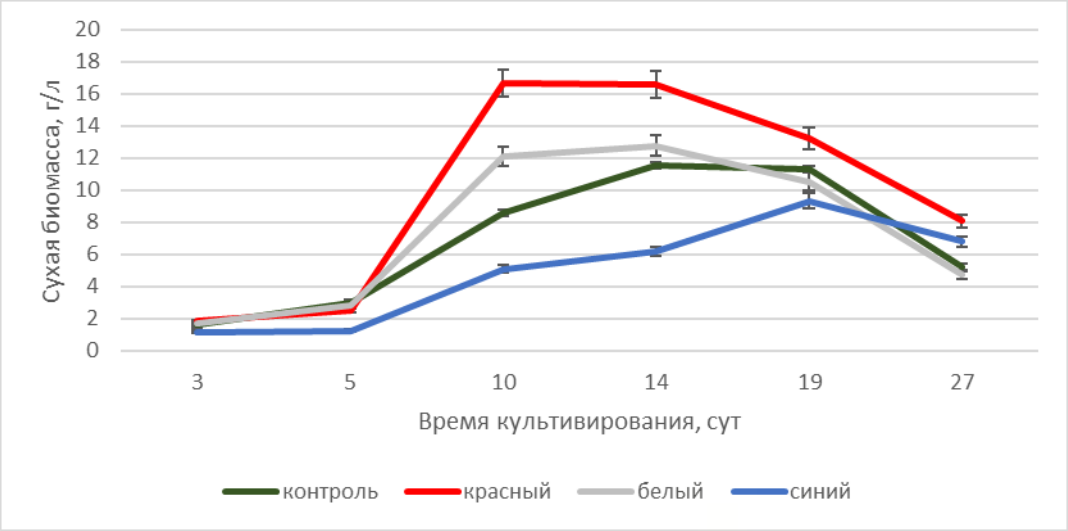
Изучено влияние селективного света, прежде всего в диапазоне 430–660 нм, на ростовые параметры и накопление вторичных метаболитов суспензионной культурой клеток *M. cordata*. Согласно плану исследования сформированы 4 группы: 1-я — контроль и 2–4-я — опытные, которые культивировали в стандартных условиях, при этом на опытные группы воздействовали светом заданного спектра (фотопериод — 12 ч). Синий свет с длиной волны 440 нм, красный — 660 нм и белый холодный (10 000 К температура свечения).

Для оценки ростовых характеристик суспензионной клеточной культуры были построены ростовые кривые, произведено сравнение сухой биомассы полученных образцов. Биосинтетическую активность определяли методом ВЭЖХ-МС (Shimadzu, модель Prominence-I LC 2030C 3D, Япония).

© А. С. Тимохина, И. А. Лупанова, 2025

Результаты и обсуждение

Развитие клеточной культуры на жидкой питательной среде в контрольной группе и в опыте под действием белого и красного света представляет собой S-образную кривую (см. рисунок). Данное поведение суспензионной клеточной культуры характерно при оптимальных условиях выращивания. Максимальное нарастание биомассы для опытных образцов приходилось на 10-е сутки культивирования, интенсивность роста соответствовала 2,8 г/сут под действием красного света и 1,8 г/сут под действием белого света соответственно [3].



Влияние света заданного спектра на ростовые кривые суспензионных культур клеток *M. cordata*

Установлено, что под действием синего света накопление биомассы в сравнении с контролем значительно снижается, ростовая кривая имеет J-образную форму, без периода равновесия (см. рисунок).

При микроскопическом исследовании под действием красного света в культуре клеток *M. cordata* наблюдается большее количество окрашенных клеток и повышается их агрегированность. В сравнении с контролем по данным ВЭЖХ-МС под действием красного света накопление сангвинарина увеличивается в 5 раз.

Выводы

По результатам исследования ростовых и биосинтетических характеристик суспензионной клеточной культуры *M. cordata* под действием экзогенных факторов, наибольший выход сухой биомассы и накопление целевого БАВ — сангвинарина — происходит в культуре, культивируемой под воздействием красного света.

Таким образом, исследования показывают, что селективный свет, особенно в красном спектре, имеет значительное влияние на ростовые характеристики и биосинтез вторичных метаболитов в клеточных культурах *M. cordata*. Эти данные могут стать основой для дальнейших исследований, направленных на оптимизацию условий культивирования и повышение выхода целевых БАВ, что имеет значение для фармацевтической промышленности и биотехнологии.

Литература

1. Цыбулько Н. С., Мясникова С. Б. Коллекция клеточных культур как альтернативный источник получения биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020. Т. 23 (2). С. 12–17.

2. Huang P., Cheng P., Sun M. et al. Systemic review of Macleaya cordata: genetics, biosynthesis of active ingredients and functions // Medicinal Plant Biology. 2024. Vol. 3. P. e020.

3. Носов А. М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. С. 386.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-139

ВЛИЯНИЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПАНСИЮ КЕРАТИНОЦИТОВ ЛИНИИ НАСАТ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КОЛЛАГЕНОВОЙ МАТРИЦЕЙ

EFFECT OF HUMAN PLATELET LYSATE ON THE EXPANSION OF HACAT KERATINOCYTES AND THEIR INTERACTION WITH COLLAGEN MATRIX

Л. Н. Токтохоева[1], Н. П. Рабданова[1], М. В. Игнатьева[1,2], С. Г. Намсрайн[1,2], Ю. А. Капустина[1], А. П. Цыбденова[1,2], Э. Б. Дашинимаев[1], Ю. С. Балханов[2]

[1]Бурятский государственный университет им. Д. Банзарова, Улан-Удэ
[2]ООО «Шэнэскин», Улан-Удэ

L. N. Toktokhoeva[1], N. P. Rabdanova[1], M. V. Ignatieva[1,2], S. G. Namsrain[1,2], Yu. A. Kapustina[1], A. P. Tsybdenova[1,2], E. B. Dashinimaev[1], Yu. S. Balkhanov[2]

[1]Dorzhi Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude
[2]Sheneskin LLC, Ulan-Ude

✉ tsybdenova.aryuna@mail.ru

Аннотация

Изучено влияние лизата тромбоцитов человека на пролиферацию клеток линии HaCaT при культивировании на коллагеновой подложке. Установлена адгезия и экспансия кератиноцитов в питательной среде с лизатом тромбоцитов на культуральном пластике и коллагеновых матрицах. Отмечено повышение экспрессии белков ламинина, что подтверждает регенеративный потенциал системы.

Abstract

The effect of human platelet lysate on the proliferation of HaCaT cells during cultivation on a collagen substrate was studied. Adhesion and expansion of keratinocytes in a nutrient medium with platelet lysate on culture plastic and collagen matrices was established. An increase in the expression of laminin proteins was noted, which confirms the regenerative potential of the system.

Кератиноциты HaCaT являются широко используемой моделью эпидермальных клеток человека. Восстановление кожи и регенерация эпителия тесно связаны с взаимодействием клеток с внеклеточным матриксом, основными компонентами которого являются коллаген и ламинин. Лизат тромбоцитов человека (hPL), богатый факторами роста (PDGF, EGF, TGF-β), стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, регулирует синтез матричных белков, что важно для эффективного ведения клеток *in vitro* и создания биоинженерных кожных эквивалентов [1, 2].

Цель — изучить влияние лизата человека на экспансию HaCaT, культивируемых на коллагеновой подложке, и оценить изменения экспрессии ключевых компонентов внеклеточного матрикса.

Методы

HaCaT культивировали на коллагеновых матрицах в среде DMEM с 5 % hPL (Бурятская республиканская станция переливания крови МЗ РБ) и в контроле с 10 % FBS (GK, Китай). Пролиферацию оценивали с помощью теста МТТ через 72 ч. Изучали экспрессию ламининовых белков (LAMA3, LAMB3) методом количественной ПЦР.

Результаты

hPL стимулировал пролиферацию HaCaT на коллагеновой подложке, увеличивая клеточную массу на 15 % по сравнению с контролем через 72 ч. Клетки на коллагене при культивировании с hPL демонстрировали выраженную адгезию, характерную для эпителия. Экспрессия белков ламининовой группы повышалась под воздействием hPL. Активизация процессов синтеза белков ламининовой группы и взаимодействия кератиноцитов с коллагеновой матрицей формируют среду, способствующую эпидермальной регенерации.

© Л. Н. Токтохоева, Н. П. Рабданова, М. В. Игнатьева, С. Г. Намсрайн, Ю. А. Капустина, А. П. Цыбденова, Э. Б. Дашинимаев, Ю. С. Балханов, 2025

Выводы

Лизат тромбоцитов человека является эффективным стимулятором экспансии кератиноцитов HaCaT и способствует их взаимодействию с коллагеновой матрицей. Повышение экспрессии ламинина и укрепление адгезии клеток на коллагене создают условия для формирования функциональной тканеинженерной конструкции. Данные результаты подтверждают перспективность применения hPL для экспансии клеток на коллагеновых подложках в тканевой инженерии и для решений в регенеративной медицине.

Литература

1. Baik S. Y. et al. Effects of Platelet Lysate Preparations on the Proliferation of HaCaT Cells // Annals of Laboratory Medicine. 2014. Vol. 34. P. 43–50.

2. Burnouf T., Strunk D., Koh M. B. C., Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? // Biomaterials. 2016. Vol. 76. P. 371–387.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-140

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА И КЛЕТКАМИ ЛИНИИ THP-1 *

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTS OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN'S MONOCYTES AND THP-1 CELL LINE

Д. И. Усанина[1,2], М. С. Бочкова[1,2], К. Ю. Шардина[1], С. А. Заморина[1,2]

[1] *Институт экологии и генетики микроорганизмов — филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь*
[2] *Пермский государственный университет*

D. I. Usanina[1,2], M. S. Bochkova[1,2], K. Yu. Shardina[1], S. A. Zamorina[1,2]

[1] *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms — branch of the PFRC UB RAS, Perm*
[2] *Perm State University*

✉ usanina_d@mail.ru

Аннотация

Оксид графена — перспективный материал для различных биомедицинских применений. Изучали влияние наночастиц с различными параметрами на цитокиновый профиль здоровых и опухолевых моноцитов (THP-1) при 72-часовой инкубации. Установлено, что здоровые клетки были в большей степени подвержены влиянию частиц. Наибольшим эффектом обладали частицы размером 100–200 нм, покрытые линейным (для моноцитов) или разветвленным (для THP-1) полиэтиленгликолем.

Abstract

Graphene oxide is a promising material for various biomedical applications. The study investigated the effects of nanoparticles with different parameters on the cytokine profile of healthy and tumor monocytes (THP-1) during 72-hour incubation. It was found that healthy cells were more susceptible to the influence of the particles. The greatest effects were observed with 100–200 nm particles coated with linear (monocytes) or branched polyethylene glycol (THP-1).

Изучали влияние наночастиц пегилированного оксида графена на продукцию цитокинов моноцитами периферической крови здоровых доноров и клетками линии THP-1 (острый моноцитарный лейкоз).

Исследование проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией BMA 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 30.08.2019. У всех добровольцев (N = 4, 22 ± 2 года) было получено информированное согласие.

Мононуклеарные клетки выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности Диаколла-1077 (плотность 1,077 г/см^3) (ДиаМ, Россия). CD14$^+$-клетки выделяли при помощи иммуномагнитной сепарации (частицы MicroBeads, human (Miltenyi Biotec, Германия)).

Использовали наночастицы оксида графена (ОГ) размером 100–200 нм (П-ОГм) и 1–5 мкм (П-ОГб) (Ossila Ltd., Шеффилд, Великобритания), покрытые линейным (П-ОГ) и 8-разветвленным (рП-ОГ) полиэтиленгликолем (ПЭГ). Модификация и характеристики наночастиц описаны ранее [1].

Моноциты ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) и клетки линии THP-1 культивировали 72 ч ($5 \cdot 10^4$ кл/мл) в 96-луночных планшетах в полной питательной среде (RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 2 мМ L-глутамина, 100 Ед пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В и 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки) с наночастицами ОГ в CO_2-инкубаторе (37 °С, 5 % CO_2). Наночастицы вносили до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл. После культивирования супернатанты клеточных культур собирали и замораживали.

Количественное определение цитокинов в супернатантах производили в проточном флуоресцентном анализаторе MAGPIX (BioRad, США) с использованием коммерческого набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening 48-plex.

Статистическую обработку данных проводили с использованием GraphPad Prism 8.0.1. Для анализа использовали тест Фридмана и post-hoc тест Данна для множественных сравнений. Уровень значимости принимали 0,05. Результаты исследования представлены в таблице.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 124021900006-5.

© Д. И. Усанина, М. С. Бочкова, К. Ю. Шардина, С. А. Заморина, 2025

Влияние наночастиц пегилированного оксида графена на продукцию цитокинов моноцитами периферической крови здоровых доноров и клетками линии THP-1

Тип наночастиц	Моноциты	THP-1
П-ОГм	25 мкг/мл: ↑ MIP-1α, G-CSF, TNF-β, IL-9, IL-1α, IL-1ra, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p70), IL-16, IL-17, IFN-α2, IFN-ɣ, MCP-1, MCP-3, MIG, LIF, SCF, TRAIL, CTACK, Basic FGF, GRO-α, MIP-1β, TNF-α, Eotaxin, PDGF-BB	5 мкг/мл: ↓ HGF; 25 мкг/мл: ↑ MIP-1α, G-CSF; ↓ SCGF-β
рП-ОГм	–	5 мкг/мл: ↓ HGF; 25 мкг/мл: ↑ MIP-1α, G-CSF; ↓ HGF, SCGF-β, RANTES, TNF-β, IL-9
П-ОГб	5 мкг/мл: ↑ M-CSF; 25 мкг/мл: ↑ IL-18, MCP-1, MCP-3, M-CSF	25 мкг/мл: ↑ MIP-1α, G-CSF; ↓ SCGF-β
рП-ОГб	25 мкг/мл: ↑ MIP-1α, G-CSF, TNF-β, IL-9, IL-1α, IL-1ra, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-17, IFN-α2, MIG, MIP-1β, MCP-3, LIF, SCF, CTACK, Basic FGF, TNF-α, Eotaxin	25 мкг/мл: ↓ RANTES
Нет эффекта	MIF, VEGF, IP-10, IL-8, IL-2Rα, SDF-1α, IL-12 (p40), GM-CSF, IL-13, IL-3, SCGF-β, RANTES, HGF	MIF, VEGF, IP-10, IL-8, IL-5, MIP-1β, TNF-α, Eotaxin, PDGF-BB
Уровень ниже порога детекции	IL-5, IL-15, β-NGF	IL-1α, IL-1ra, IL-1β, IL-2, IL-2Rα, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, β-NGF, SDF-1α, GM-CSF, MCP-1, MCP-3, MIG, IFN-α2, IFN-ɣ, LIF, SCF, TRAIL, M-CSF, CTACK, Basic FGF, GRO-α

Установлено, что моноциты из крови здоровых доноров в большей степени подвержены влиянию наночастиц оксида графена: обнаружены 45 цитокинов, в то время как в супернатантах клеток линии THP-1 — 16. Интересно, что наночастицы рП-ОГм не оказывали никаких эффектов на здоровые моноциты, при этом клетки линии THP-1, напротив, продуцировали наибольшее количество цитокинов. На моноциты же наибольший эффект оказали частицы П-ОГм (30 цитокинов). Стоит также отметить, что практически все отмеченные эффекты наблюдались при добавлении наночастиц в концентрациях 25 мкг/мл, в то время как низкие дозы оказывали влияние лишь на 2 цитокина (M-CSF и HGF).

Схожие эффекты наночастиц ОГ на клетки наблюдались в случае 2 цитокинов: частицы в концентрации 25 мкг/мл повышали секрецию MIP-1α и G-CSF. В отношении 2 цитокинов эффекты были противоположны: секреции TNF-β и IL-9 повышалась в супернатантах моноцитов, но снижалась в супернатантах клеток линии THP-1 (но эффекты оказывали наночастицы разных типов).

Таким образом, наночастицы пегилированного оксида графена оказывают разные эффекты на здоровые и опухолевые моноциты, зависимые от концентрации, размера, функционализации частиц.

Литература

1. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V. et al. Interaction of graphene oxide modified with linear and branched PEG with monocytes isolated from human blood // Nanomaterials. 2021. Vol. 12, No. 126. URL: https://www.mdpi.com/2079-4991/12/1/126 (date of access: 18.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-141

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМАЯ ДОСТАВКА НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ PLGA В КЛЕТКИ ГЛИОМ

PLGA-BASED INTRACELLULAR POTENTIAL-DEPENDENT DELIVERY OF NANOPARTICLES INTO GLIOMA CELLS

А. А. Филин[1], Е. А. Калачева[1], П. А. Мельников[1], Ю. А. Малиновская[2], Т. С. Ковшова[2]

[1]Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Москва
[2]Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

A. A. Filin[1], E. A. Kalacheva[1], P. A. Melnikov[1], Yu. A. Malinovskaya[2], T. S. Kovshova[2]

[1]V. P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow
[2]D. I. Mendeleev Russian University of Chemistry and Technology, Moscow

✉ z99c@mail.ru

Аннотация

Перспективным направлением терапии низкодифференцированных опухолей головного мозга является разработка наноразмерных систем доставки на основе биосовместимых полимеров (PLGA), способных доставлять терапевтические агенты в опухолевые клетки. В результате данной работы продемонстрирована возможность модуляции захвата PLGA клетками глиом путем модуляции уровня мембранного митохондриального потенциала (Δψm).

Abstract

A promising approach to the therapy of low-differentiated brain tumors is the development of nanosized delivery systems based on biocompatible polymers (PLGA) capable of delivering therapeutic agents to tumor cells. As a result of this work, the possibility of modulating the capture of PLGA by glioma cells by modulating the level of the membrane mitochondrial potential (Δψm) has been demonstrated.

Существенной проблемой современной нейроонкологии на сегодняшний день является поиск современных методов терапии низкодифференцированных опухолей головного мозга (анапластической астроцитомы, мультиформной глиобластомы и медуллобластомы). Эффективному лечению препятствуют иммуносупрессивное микроокружение опухоли, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и обширная клеточная гетерогенность. Лекарственные формы на основе наночастиц (НЧ) сейчас являются одной из наиболее перспективных ветвей развития терапии низкодифференцированных опухолей. НЧ позволяют инкапсулировать доставляемый терапевтический агент, защищая организм пациента от его системного, неспецифического влияния, и одновременно защитить сам препарат от агрессивной опухолевой среды. Механизм интернализации НЧ в клетки и внутриклеточное распределение, которые во многом зависят от митохондриального мембранного потенциала (Δψm), могут оказывать существенное влияние на эффективность терапии и диагностики. PLGA — линейный алифатический сополимер полимолочной (PLA) и полигликолевой (PGA) кислоты. Одобрен Food and Drugs Administration (FDA) и European Medicines Agency (EMA) для доставки около 15 препаратов при различного рода заболеваний [1].

PLGA, содержащие флуоресцентную метку (Cy5), получали методом простых эмульсий. Поглощение PLGA НЧ клетками изучали на первичных культурах человеческих глиом (3821, 5522, 4434), а также линиях мышиных (CT-2A, GL-261) и крысиных глиом (C6). Для окраски митохондрий потенциал-зависимым образом использовали красители JC-1 и TMRM (тетраметилродамин), для окраски лизосом — LysoTracker Green. Эффективность захвата PLGA-Cy5 НЧ клетками определяли методом проточной цитометрии. Оценку путей интернализации и внутриклеточной локализации PLGA НЧ проводили методом конфокальной микроскопии. Изучали влияние потенциала митохондриальной мембраны клеток, а также модуляторов митохондриального потенциала [2-дезоксиглюкозы (2-DG) и фенформина (FFM)] на интернализацию PLGA НЧ.

Установлено, что первичные культуры опухолей головного мозга человека обладали большей способностью к захвату PLGA НЧ, по сравнению с линиями мышиных и крысиных глиом, при этом клетки 5522 и 3821 обладали высоким Δψm, но низкой интернализацией (~ 32 и ~ 46 %), а клетки 4434, имея минимальный Δψm, продемонстрировали 99–96%-е поглощение PLGA НЧ. Культуры 3821 и 5522 показали высокую степень интернализации

© А. А. Филин, Е. А. Калачева, П. А. Мельников, Ю. А. Малиновская, Т. С. Ковшова, 2025

НЧ через кавеолин- и клатрин-зависимый эндоцитоз, что соотносится с высокими значениями Δψm. Линия 4434 не демонстрировала колокализации НЧ с органеллами. Для клеток GL-261 был характерен преимущественно кавеолин-зависимый путь, а для CT-2A и C6 — оба пути интернализации, несмотря на различные значения Δψm. Модулятор потенциала 2-DG снижал Δψm в клетках 5522, изменяя путь эндоцитоза с клатрин-зависимого на кавеолин-зависимый. В клетках 3821 модулятор потенциала FFM повышал Δψm и интернализацию PLGA НЧ. В клетках CT-2A модуляторы потенциала вызывали противоположные эффекты: 2-DG снижал интернализацию, а FFM, напротив, повышал. В клетках GL-261 добавление модуляторов потенциала обоих типов снижало захват НЧ.

Таким образом, поглощение PLGA НЧ клетками глиом зависело от уровня Δψm. Его модуляция позволила изменять механизм эндоцитоза и эффективность интернализации, что открывает новые перспективы для таргетной доставки терапевтических агентов. Полученные данные могут стать основой для разработки новых стратегий терапии низкодифференцированных опухолей головного мозга.

Литература

1. Rafiei P., Haddadi A. A robust systematic design: optimization and preparation of polymeric nanoparticles of PLGA for docetaxel intravenous delivery // Materials Science and Engineering. 2019. Vol. 104.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-142

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА И СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ КАРОТИНОИДОВ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* X5 *

EFFECT OF CARBON SOURCE AND STRESS FACTORS ON CAROTENOID PRODUCTION BY *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* X5

А. С. Филиппова[1,2], А. С. Леонова[1], И. А. Нечаева[1]

[1] *Тульский государственный университет*
[2] *Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии НИЦ «БиоХимТех» ТулГУ, Тула*

A. S. Filippova[1,2], A. S. Leonova[1], I. A. Nechaeva[1]

[1] *Tula State University*
[2] *Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Scientific Research Center "BioChemTech", Tula State University*

✉ stasya.filippova.01@gmail.com

Аннотация

Показана способность бактерий *Rhodococcus qingshengii* X5 синтезировать пигменты в условиях углеродного, температурного, окислительного и фотоокислительного стресса. Экстракты каротиноидов поглощают свет в диапазоне 430–500 нм. Наиболее высокий выход продукта наблюдается при культивировании на среде с глицерином под действием фотоокислительного стресса и составляет 9,09 мкг/г биомассы.

Abstract

Rhodococcus qingshengii X5 produced carotenoid pigments when exposed to: carbon limitation, temperature fluctuations, oxidative stress, and photooxidative stress. The carotenoid extracts exhibited light absorption at 430–500 nm. The highest pigment yield (9,09 μg/g CFS biomass) was achieved during cultivation on glycerol medium under photooxidative stress.

Каротиноиды являются наиболее многочисленной группой окрашенных органических пигментов [1]. Они обладают провитаминными, антиоксидантными, иммуностимулирующими, геропротекторными и лечебными свойствами [2]. Каротиноиды синтезируются многими фотосинтезирующими и нефотосинтезирующими микроорганизмами, в том числе бактериями рода *Rhodococcus*. Основным преимуществом родококков является наличие гибкого обмена веществ и широкого метаболического профиля, позволяющих им существовать в стрессовых условиях [1]. Стоит отметить, что представители рода *Rhodococcus* являются единственными представителями актиномицетов, способными одновременно синтезировать ароматические и кетозамещенные каротиноиды [3].

Объектом исследования выступили пигментированные актинобактерии *Rhodococcus qingshengii* X5. Продукцию каротиноидов изучали на минеральной среде с использованием в качестве источника углерода глюкозы (0,5 %), в качестве контроля, или глицерина (1 %), вызывающего карбонильный стресс вследствие недостатка легкоокисляемых углеводов. Кроме этого, определили влияние низкой температуры (10 °C), фотоокислительного (белый свет, 3000 люкс) и окислительного (12,5 ммоль/л H_2O_2) стресса на процесс каротиногенеза. Для анализа получали ацетоновые экстракты каротиноидов из бактериальной биомассы.

Продукция каротиноидов при использовании различных субстратов и стрессоров оценивали методом электронной спектроскопии в диапазоне длин волн 200–800 нм (рис. 1).

Экстракты, используемые для спектроскопии, имели оранжевый цвет и поглощали свет в диапазоне длин волн 430–500 нм вне зависимости от условий культивирования. Поглощение света в данном диапазоне и окраска экстракта свидетельствуют о наличии системы из более чем 9 сопряженных связей в продуцируемых соединениях [4].

Общее содержание каротиноидов в экстрактах определяли путем экстракции петролейным эфиром и измерения оптической плотности раствора [5]. Содержание рассчитывали по формуле

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № FEWG-2024-0003.

© А. С. Филиппова, А. С. Леонова, И. А. Нечаева, 2025

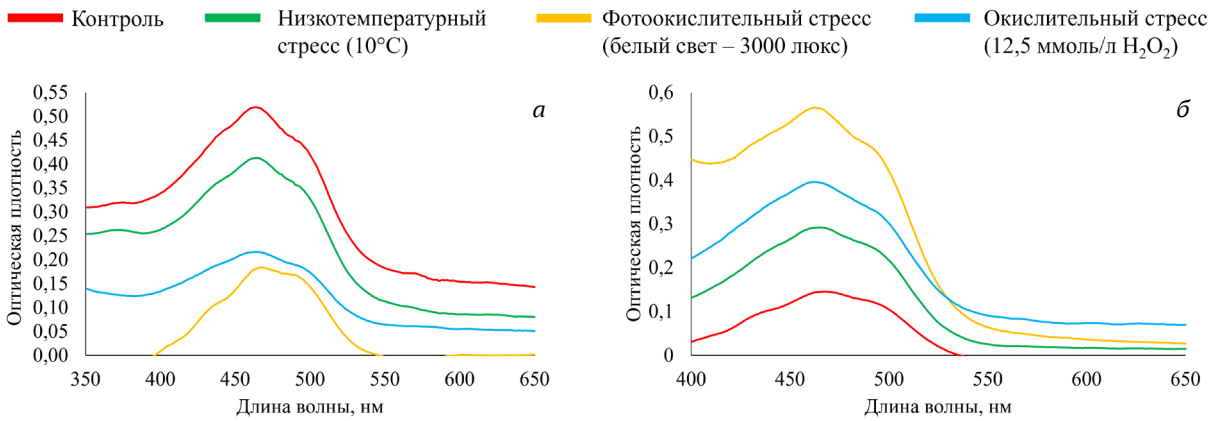


Рис. 1. Электронные спектры экстрактов каротиноидов, полученные при культивировании на средах с глюкозой (*а*) или глицерином (*б*) под действием стрессоров

$$c = \frac{V \cdot A_{470} \cdot 100}{21 \cdot m},$$

где c — содержание каротиноидов, мкг/г влажной биомассы; V — объем петролейного эфира, используемого для экстракции, мл; A_{470} — оптическая плотность; m — количество биомассы, г.

Результаты расчета содержание каротиноидов в пробах представлены на рис. 2.

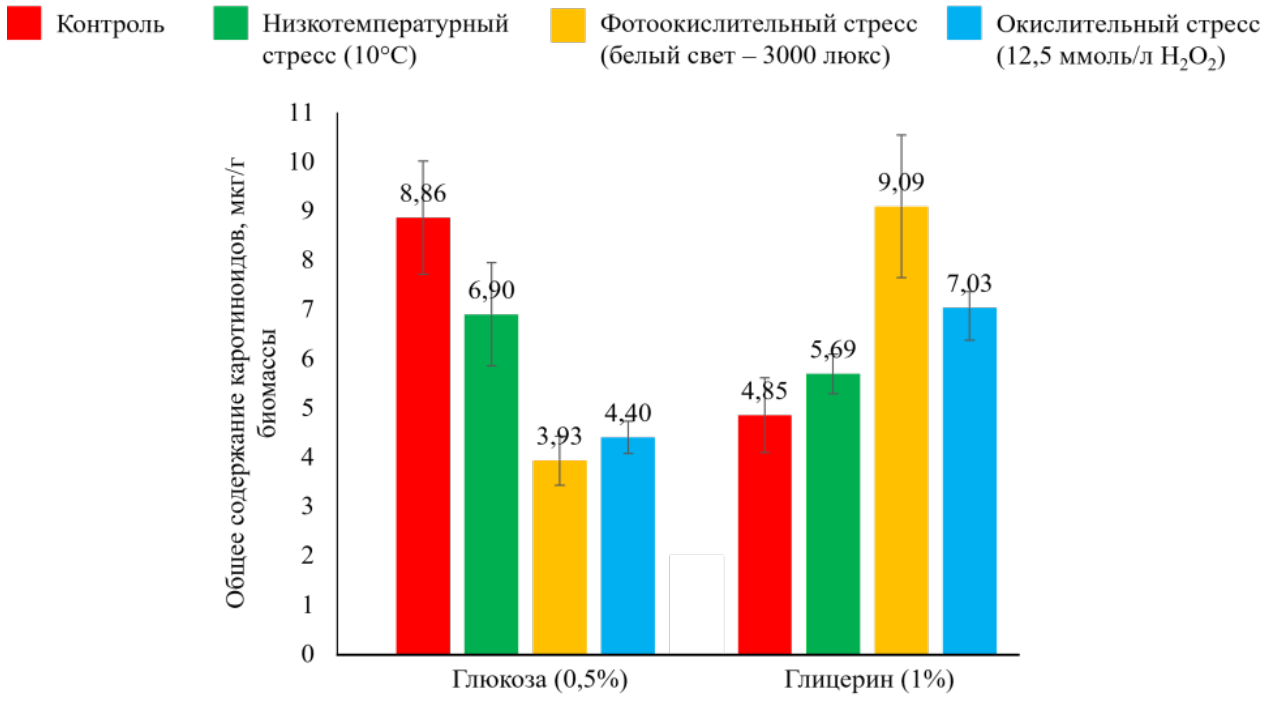


Рис. 2. Диаграмма содержания каротиноидов в экстрактах после культивирования на различных источниках углерода при действии стрессоров

Стрессовые факторы при культивировании на среде с глюкозой подавляют процесс каротиногенеза, о чем свидетельствует снижение содержания каротиноидов. Культивирование в условиях углеродного голодания (на глицерине) под действием фотоокислительного и окислительного стресса приводит к увеличению выхода каротиноидов по сравнению с контролем. Наиболее высокая продукция каротиноидов у *R. qingshengii* X5 наблюдается в условиях фотоокислительного стресса на среде с глицерином и составляет 9,09 мкг/г биомассы.

Литература

1. Ядерец В. В., Карпова Н. В., Глаголева Е. В. и др. Каротиноиды: обзор основных биотехнологических способов и условий получения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14 (1). С. 41–54.

2. Васимов Д. Д., Новиков В. С. Спектроскопия комбинационного рассеяния света β каротина: экспериментальное исследование и численное моделирование // Технические науки. 2024. С. 30–36.

3. Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in the phylum Actinobacteria // Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches / ed. Misawa N. Singapore: Springer, 2021. P. 175–181.

4. Курегян А. Г. Спектрофотомерия в анализе каротиноидов // Фундаментальные исследования. 2015. № 2. С. 5166–5172.

5. An G. H., Schuman D. B., Johnson E. A. Isolation of Phaffia rhodozyma mutants with increased astaxanthin content // Applied and Environmental Microbiology. 1989. Vol. 55 (1). P. 116–124.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-143

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА *

PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Д. А. Филиппова[1,2], Н. Б. Рудометова[2], Л. А. Кисакова[2], Д. Н. Кисаков[2], Т. Е. Петухова[2], О. Ю. Рыбалкина[3], Л. А. Ан[3], И. С. Черняев[3], А. П. Рудометов[2], Л. И. Карпенко[2]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3]*НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН*

D. A. Filippova[1,2], N. B. Rudometova[2], L. A. Kisakova[2], D. N. Kisakov[2], T. E. Petukhova[2], O. Y. Rybalkina[3], L. A. An[3], I. S. Chernyaev[3], A. P. Rudometov[2], L. I. Karpenko[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[3]*E. D. Goldberg Research Institute of Physics and Mathematics, Tomsk Scientific Center RAS*

✉ filippda73@yandex.ru

Аннотация

Существует целый ряд заболеваний, включая онкологические, вирусные и соматические, сопровождающихся развитием симптоматической анемии. Одной из причин вторичной анемии является снижение или полное прекращение синтеза эритропоэтина, что делает заместительную терапию этим гормоном важным компонентом лечения. В настоящее время в России существует потребность в получении дешевого и доступного препарата эритропоэтина из перечня ЖНВЛП.

Abstract

There are a number of diseases, including cancer, viral diseases, and somatic diseases, which can lead to symptomatic anemia. One of the causes of secondary anemia is a decrease or complete cessation of erythropoietin synthesis, which makes hormone replacement therapy an important component of treatment. Currently, there is a need in Russia to obtain a cheap and accessible erythropoietin drug from the list of essential medicines.

Эритропоэтин (EPO) — гормон, регулирующий эритропоэз, стимулирует созревание эритроцитов; кислый гликопротеин из 165 аминокислот и четырех углеводных цепей; структура — глобула с четырьмя антипараллельными α-спиралями, двумя β-складками, двумя внутренними дисульфидными связями, необходимыми для активности.

На первом этапе была разработана аминокислотная последовательность гена эритропоэтина на основе EPO человека — P01588_EPO_HUMAN. В природный ген добавлены сигнальная последовательность GLuc (на N-конец) и His-тэг (6×His) — на С-конец для очистки. Проведена обратная трансляция (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) и оптимизация кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих (https://www.jcat.de/).

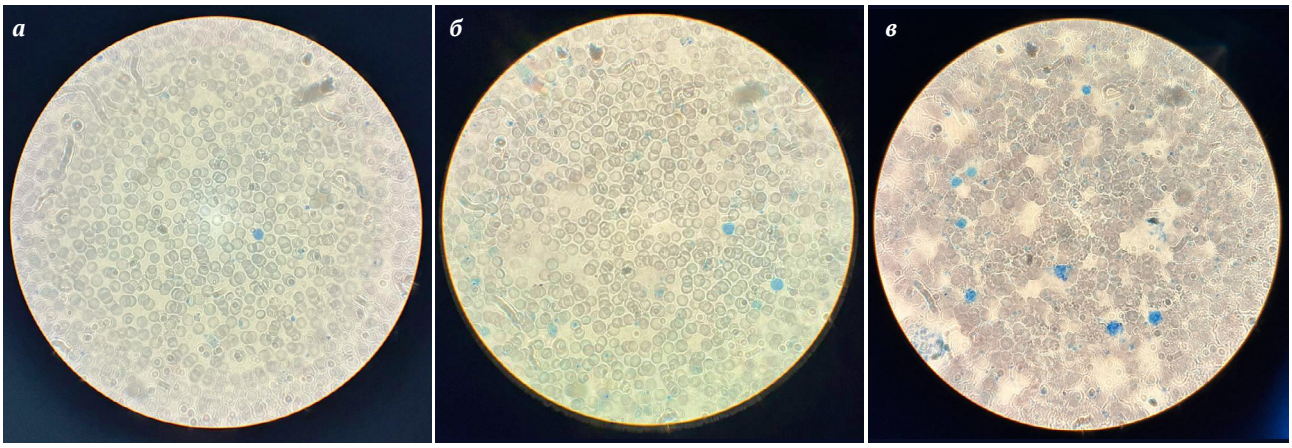
Ген синтезировали и клонировали в составе интеграционного плазмидного вектора. Стабильный продуцент EPO получали на клеточной линии CHO-K1 с применением системы Sleeping Beauty transposon system (https://blog.addgene.org/sleeping-beauty-awakens-for-genome-engineering).

Экспрессию трансгена подтверждали вестерн-блотом с использованием моноклонального антитела к 6×His. В культуральной среде обнаружен белок массой 34 кДа, соответствующий EPO. Проводили очистку белка с использованием хроматографического сорбента Ni-IMAC (VDO BioTech), степень очистки оценивали методом электрофореза в ПААГ. Фракции с целевым белком диализовали против фосфатно-солевого буфера, концентрировали, подтверждали наличие EPO в концентрате электрофорезом в ПААГ.

Функциональную активность препарата оценивали на мышах линии Balb/c, препарат вводили подкожно. Через 3 суток производили забор крови, окрашивание препаратов крови раствором бриллиантового крезилового синего, микроскопирование (увеличение 100×). Обнаружено увеличение числа ретикулоцитов по сравнению с интактными животными, что подтверждает стимулирующее действие препарата EPO в созревании эритроцитов (см. рисунок).

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

© Д. А. Филиппова, Н. Б. Рудометова, Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, Т. Е. Петухова, О. Ю. Рыбалкина, Л. А. Ан, И. С. Черняев, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2025



Микрофотографии образцов крови мышей после введения препарата EPO и окрашивания раствором крезилового синего: *а* — образец крови интактной мыши (отрицательный контроль); *б* — образец крови мыши после подкожного введения коммерческого препарата эритропоэтина в концентрации 80 МЕ/мл (положительный контроль); *в* — образец крови мыши после подкожного введения очищенного рекомбинантного препарата эритропоэтина (10 нг)

Было определено общее количество эритроцитов и содержание гемоглобина и гематокрита с помощью анализатора Mythic 18 vet в периферической крови доксорубицин-индуцированных (доза — 6 мг/кг) анемичных мышей линии C57BL/6 после введения полученного препарата EPO и коммерческого препарата «Рекормон» (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Швейцария). «Рекормон» вводили подкожно пятикратно ежедневно в дозе 10 ЕД/мышь (суммарная доза 50 ЕД/мышь), полученный препарат EPO вводили ежедневно подкожно в количестве 20 нг (суммарная доза 100 нг). В первый день введения оба препарата были введены за 24 ч до введения доксорубицина (см. таблицу).

Количество эритроцитов и содержание гемоглобина и гематокрита на третий день опыта

Критерий	Интактная группа	Доксорубицин	Доксорубицин + «Рекормон»	Доксорубицин + препарат EPO, 100 нг
Эритроциты	11,43 ± 1,13	7,66 ± 0,67	10,89 ± 0,32 $P < 0,01$	10,92 ± 0,12 $P < 0,01$
Гемоглобин	15,94 ± 0,60	10,40 ± 0,43	17,36 ± 0,56 $P < 0,01$	10,12 ± 0,23 $P < 0,01$
Гематокрит	39,62 ± 3,90	30,82 ± 3,36	42,00 ± 1,28 $P < 0,01$	41,86 ± 0,79 $P < 0,01$

Согласно результатам, представленным в таблице, полученный препарат EPO демонстрирует сопоставимую эффективность с коммерческим препаратом по всем основным показателям. При этом у полученного препарата наблюдается меньшая стандартная погрешность, что указывает на более стабильный эффект. Таким образом, он не уступает коммерческому аналогу и превосходит его по воспроизводимости, что делает его перспективным для дальнейших исследований.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-144

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ *EMPETRUM NIGRUM* ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ *

PHYTOCHEMICAL STUDY AND SAFETY ASSESSMENT OF *EMPETRUM NIGRUM* FOR FOOD APPLICATIONS

А. С. Фролова, А. М. Федорова, И. С. Милентьева

Кемеровский государственный университет

A. S. Frolova, A. M. Fedorova, I. S. Milentyeva

Kemerovo State University

✉ frolova.anna.s@mail.ru

Аннотация

Хронический стресс вызывает дезадаптацию, увеличивая риск патологий. Цель — провести комплексную оценку фитохимического состава и безопасности растительного сырья *Empetrum nigrum*. Водяника черная богата флавоноидами, хлорофиллом, каротиноидами. Сырье микробиологически чистое. Результаты подтверждают возможность использования в качестве сырья для разработки адаптогенных средств и функциональных продуктов питания.

Abstract

Chronic stress causes maladaptation, increasing the risk of pathologies. Objective: to conduct a comprehensive assessment of the phytochemical composition and safety of Empetrum nigrum plant material. It is rich in flavonoids, chlorophyll, carotenoids. The raw material is microbiologically pure. The results confirm the possibility of using it as a raw material for the development of adaptogenic agents and functional foods.

Стресс и его влияние на адаптационные механизмы организма является предметом интенсивных исследований. Хронический стресс вызывает дезадаптацию, увеличивая риск различных патологических состояний, требующих фармакологического вмешательства [1]. Согласно данным Всероссийского центра изучения общественного мнения, полученным в ходе опроса 1600 респондентов в возрасте от 18 лет, распространенность стресса среди взрослого населения России составляет 90 % [2]. Поскольку проблема стресса приобретает все более выраженное патогенетическое и клиническое значение, обуславливая широкий спектр адаптационных нарушений и заболеваний, особую актуальность приобретает разработка новых антидепрессивных препаратов и биологически активных веществ (БАВ). В качестве потенциального источника исследуется лекарственное сырье растительного происхождения.

Виды *Empetrum* L., в частности *Empetrum nigrum*, характеризуются высоким содержанием флавонолов, включая кверцетин, рутин, мирицетин, нарингенин, нарингин, морин и кемпферол, а также антоцианов [3, 4]. Представители рода *Empetrum* L. демонстрируют широкий спектр биологической активности, что обусловлено их комплексным фитохимическим составом. Фенольные соединения, в частности флавоноиды, представляют собой основную группу биологически активных метаболитов, сконцентрированных преимущественно в надземных органах растений данного рода.

Функциональные продукты питания, содержащие адаптогены, заслуживают особого внимания в контексте стресс-протекции. Многочисленные исследования показывают, что адаптогены способствуют нормализации функций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, улучшая адаптацию организма к стрессу и снижая симптомы тревоги и депрессии [5]. Получение функциональных продуктов питания с адаптогенными свойствами является перспективным направлением.

Цель исследования — провести комплексную оценку фитохимического состава и безопасности растительного сырья *Empetrum nigrum*.

В качестве объекта исследования выбрали растение Сибирского федерального округа, а именно надземную часть водяники черной (*Empetrum nigrum*).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Разработка биологически активных добавок, состоящих из метаболитов растительных объектов *in vitro*, для защиты населения от преждевременного старения» (проект № FZSR-2024-0008) с использованием оборудования ЦКП «Инструментальные методы анализа в области прикладной биотехнологии» на базе КемГУ.

© А. С. Фролова, А. М. Федорова, И. С. Милентьева, 2025

Содержание флавоноидов и полисахаридов определяли согласно методике Н. А. Кузьмичева [6]. Количество хлорофилла и каротиноидов определяли методом спектрофотометрии [7].

Микробиологические показатели безопасности оценивались по количеству мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерий группы кишечной палочки (БГКП), патогенных микроорганизмов, дрожжей и плесени.

Результаты общего фитохимического исследования приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты общего фитохимического анализа

БАВ	Содержание, %
Флавоноиды	18,68 ± 0,93
Полисахариды	0,10 ± 0,05
Хлорофилл	5,12 ± 0,38
Каротиноиды	3,82 ± 0,37

Надземная часть *Empetrum nigrum* отличается крайне высоким содержанием флавоноидов и хлорофилла, а также значительным уровнем каротиноидов, что может обуславливать ее выраженные антиоксидантные свойства.

Микробиологические показатели безопасности сухого растения представлены в табл. 2.

Таблица 2

Микробиологические показатели объекта исследования

Показатель	Значение	Величина допустимого уровня по ТР ТС 021/2011
КМАФАнМ, КОЕ/см^3	< 10	Не более 5×10^4
БГКП (колиформы), КОЕ/см^3 в 0,1 г	н/о	Не допускается
Патогенные, в том числе сальмонеллы, КОЕ/см^3 в 10 г	н/о	Не допускается
Дрожжи и плесени (в сумме), КОЕ/см^3	н/о	Не более 100

Примечание: н/о — не обнаружено.

По результатам проведенного микробиологического анализа образец водяники черной соответствует требованиям ТР ТС 021/2011 по изученным микробиологическим показателям. Отсутствие патогенных микроорганизмов и БГКП, а также низкие значения КМАФАнМ и количества дрожжей/плесеней свидетельствуют о высоком уровне микробиологической чистоты сырья.

Полученные результаты подтверждают возможность использования *Empetrum nigrum* в качестве сырья для разработки адаптогенных средств и функциональных продуктов питания. Дальнейшие исследования будут направлены на разработку подходов к экстракции комплекса адаптогенных вторичных метаболитов из растительных объектов Сибирского федерального округа. Планируется оценка их антимикробной, антиоксидантной и пребиотической активности *in vitro*, а также последующее выделение, структурная характеристика и анализ биоактивных свойств отдельных БАВ. Идентифицированные соединения будут использованы в качестве компонентов функциональных продуктов питания с адаптогенным действием, способствующих профилактике хронического стресса и связанных с ним заболеваний.

Литература

1. Esmaealzadeh N., Iranpanah A., Sarris J. et al. A literature review of the studies concerning selected plant-derived adaptogens and their general function in body with a focus on animal studies // Phytomedicine. 2022. Vol. 105. P. 154354.

2. Опросы общественного мнения // ТАСС. 2025. URL: https://tass.ru/obschestvo/20548267 (дата обращения: 05.05.2025).

3. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Лужанин В. Г. и др. Использование метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии для обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной Empetrum nigrum L. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. Т. 10, № 4. С. 129–137.

4. Фокина А. Д., Веснина А. Д., Фролова А. С. и др. Биоактивные вещества геропротекторной направленности // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54, № 2. С. 423–435.

5. Романчук Н. П. Мозг Homo sapiens XXI века: нейрофизиологические, нейроэкономические и нейросоциальные механизмы принятия решений // Бюллетень науки и практики. 2021. Т. 7, № 9. С. 228–270.

6. Кузьмичева Н. А. Фитохимический анализ семян пажитника сенного // Вестник фармации. 2017. Т. 2, № 76. С. 23–31.

7. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (Urtica dioica L.) // Химия растительного сырья. 2015. Т. 3. С. 105–110.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-145

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ СИНТЕТИЧЕСКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ*

DEVELOPMENT OF SYNTHETIC NUCLEIC ACID DELIVERY SYSTEMS BASED ON CALCIUM CARBONATE NANOPARTICLES

Б. Р. Хасанов[1,2], В. К. Попова[2], Е. В. Дмитриенко[2]

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

B. R. Khasanov[1,2], V. K. Popova[2], E. V. Dmitrienko[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ b.khasanov@g.nsu.ru

Аннотация

Исследование посвящено разработке систем доставки на основе композитных наночастиц карбоната кальция (CaНЧ) для транспорта синтетических нуклеиновых кислот (НК). В работе подобраны условия добавления олигонуклеотидов (ОН) в состав комплекса с CaНЧ. Для увеличения эффективности взаимодействия НК с CaНЧ был предложен способ модификации наночастиц полиэтилениминами (ПЭИ).

Abstract

The research is devoted to the development of delivery systems based on composite calcium carbonate nanoparticles (CaNPs) for the transport of synthetic nucleic acids. The conditions for the addition of oligonucleotides to the complex with CaNPs were selected in the work. To increase the efficiency of the interaction of NA with CaNPs, a method for modifying nanoparticles with polyethylenimines was proposed.

Эффективные системы доставки биологически активных соединений (БАС) способны увеличить терапевтическую эффективность лекарственных средств и снизить побочные действия на организм — за счет избирательности распределения, уменьшения токсичности препарата, а также преодоления проблем, связанных со стабильностью индивидуальных соединений в физиологических условиях [1]. Деградация немодифицированных олигонуклеотидов под действием барьерных функций организма, в том числе нуклеаз, создает ограничения для развития и применения генной терапии. Однако использование наночастиц в качестве носителей НК может служить одним из решений данной проблемы. Таким образом, разработка систем доставки синтетических нуклеиновых кислот является перспективным направлением для лечения различных заболеваний, включая онкологические и генетические.

Целью работы является разработка стабильных при физиологических условиях комплексов наночастиц карбоната кальция с синтетическими нуклеиновыми кислотами.

На первом этапе были синтезированы монодисперсные наночастицы карбоната кальция (CaНЧ). Полученные CaНЧ были охарактеризованы методом динамического светорассеяния (ДСР), их размер составил 200 ± 5 нм, а поверхностный заряд −20,2 ± 0,7 мВ. Далее исследовали оптимальные условия взаимодействия модельных ОН с CaНЧ, варьируя условия инкубации, буферные растворы, а также состав реакционной смеси при синтезе. Наибольшая эффективность связывания составила 2,1 ± 0,6 нмоль ОН на мг CaНЧ при pH 7,0.

На следующем этапе была разработана методика модификации CaНЧ с целью увеличения емкостных показателей по отношению к НК. Для этого использовались линейные и разветвленные модификации ПЭИ различной молекулярной массы. Показано, что оптимальной стратегией модификации наночастиц является инкубация с 0,5 об.% ПЭИ 70 кДа. Полученные нанокомпозиты карбоната кальция и ПЭИ (CaНЧ-ПЭИ) характеризовались размером 207 ± 30 нм и ζ-потенциалом +28,4 ± 0,5 мВ по данным ДСР. Эффективность взаимодействия CaНЧ-ПЭИ с ОН составила 13,6 ± 0,5 нмоль/мг.

Далее исследовали профиль высвобождения ОН из состава нанокомпозита. Продемонстрировано, что при физиологическим значении pH комплекс CaНЧ-ПЭИ с ОН (CaНЧ-ПЭИ-ОН) высвобождает более 40 % транс-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-24-20105).

© Б. Р. Хасанов, В. К. Попова, Е. В. Дмитриенко, 2025

портируемой НК. Для стабилизации полученного СаНЧ-ПЭИ-ОН была разработана методика повторного покрытия нанокомпозита слоем карбоната кальция. Впервые полученный нанокомпозит СаНЧ-ПЭИ-ОН-$CaCO_3$ характеризовался не то только стабильностью при pH 7,4, но и увеличенной pH-зависимой эффективностью извлечения НК при pH 5,5 и ниже.

По данным МТТ-теста на трех линиях клеток доказано отсутствие токсичности всех исследованных образцов в рабочем диапазоне концентраций вплоть до концентрации 60 мкг/мл.

По данным конфокальной микроскопии исследования наноматериалов с ковалентно присоединенным цианиновым красителем, исходя из совпадения оптического сигнала от частиц и эндосом, было показано, что материалы преодолевают мембрану клетки и преимущественно локализованы в эндосомах.

Таким образом, в ходе данной работы предложены варианты эффективного присоединения модельных олигонуклеотидов к наночастицам. Разработана методика модификации СаНЧ с помощь полиэтиленимина. Полученные нанокомпозиты исследованы методом ДСР, а также показана эффективность их взаимодействия с НК. Для наноматериала, содержащего в своем составе НК, был продемонстрирован профиль высвобождения и разработана методика модификации путем повторного покрытия нанокомпозита слоем карбоната кальция для стабилизации полученного СаНЧ-ПЭИ-ОН. Разработанные нанокомпозиты были исследованы методами МТТ и конфокальной микроскопии. Полученные в работе данные доказывают перспективность разработанных нанокомпозитов для дальнейших исследований *in vivo*.

Литература

1. Henderson M. L. et al. Gene therapy for genetic syndromes: understanding the current state to guide future care // BioTech. 2024. Vol. 13, No. 1. P. 1.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-146

СПОСОБ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ЖЕЛТОГО (БЕЛОГО) ФОСФОРА ПРИ ПОМОЩИ МИКРООРГАНИЗМОВ

NEUTRALIZATION OF YELLOW (WHITE) PHOSPHORUS WAY BY MICROORGANISMS

А. А. Хасанова[1], А. З. Миндубаев[2], Э. В. Бабынин[2], Т. В. Вдовина[1]

[1] *Казанский национальный исследовательский технологический университет*
[2] *Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»*

A. A. Khasanova[1], A. Z. Mindubaev[2], E. V. Babynin[2], T. V. Vdovina[1]

[1] *Kazan National Research Technological University*
[2] *Federal Research Center "Kazan Scientific Center RAS"*

✉ mindubaev-az@yandex.ru

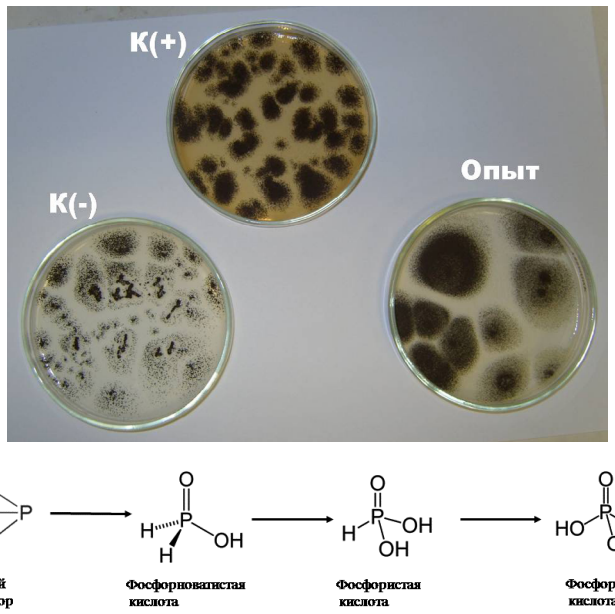
Аннотация

Белый фосфор является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Следовательно, требуются методы детоксикации данного вещества, в том числе биологические. Впервые проведены посевы *Aspergillus niger* в среду, содержащую белый (желтый) фосфор в качестве единственного источника фосфора. Грибы росли и окисляли белый фосфор до фосфата, необходимого для жизнедеятельности. Проведен поиск метаболитов белого фосфора и предложен путь его метаболизма.

Abstract

White phosphorus is one of the most dangerous environmental pollutants. Therefore, methods of detoxification of this substance, including biological ones, are required. For the first time, *Aspergillus niger* was sown in a medium containing white (yellow) phosphorus as the only source of phosphorus. The fungi grew and oxidized white phosphorus to phosphate necessary for life activity. White phosphorus metabolites were searched for and a pathway for its metabolism was proposed.

Белый фосфор (технологи чаще используют определение «желтый» для вещества технической чистоты) представляет собой один из самых токсичных загрязнителей. Поскольку он применяется в военных целях и крупнотоннажном промышленном производстве, являясь важнейшим звеном производства большинства фосфорсодержащих продуктов, данное вещество проникает в окружающую среду, оказывая на нее негативное воздействие [1].



Рост аспергиллов в средах с фосфатом (положительный контроль), без источников фосфора (отрицательный контроль) и с белым фосфором (опыт). Предполагаемый метаболический путь белого фосфора

© А. А. Хасанова, А. З. Миндубаев, Э. В. Бабынин, Т. В. Вдовина, 2025

Однако элемент фосфор обладает уникальным свойством. Он является чрезвычайно опасным в виде простых веществ и восстановленных соединений. Однако в виде фосфатов, в полностью окисленном состоянии, это биогенный элемент необходим всем формам жизни, включая людей. Поэтому у белого фосфора есть замечательные предпосылки для биодеградации, которая является одним из самых эффективных и современных методов обезвреживания промышленных, бытовых и сельскохозяйственных поллютантов.

Выделен штамм *Aspergillus niger* F-4815D, источником которого стала емкость с белым фосфором, содержавшая жизнеспособные споры [2]. Этот факт является неординарным и демонстрирует поразительную жизнестойкость микроорганизмов. Рост грибов ускоряет окисление белого фосфора в фосфат по сравнению со стерильной средой. Это позволяет создать биологический метод обезвреживания белого фосфора, вещества 1-го класса опасности.

Анализ колориметрическим методом [3] показал, что биодеградация белого фосфора действительно имеет место. В идентичных условиях гриб *A. niger* F-4815D достоверно ускоряет окисление белого фосфора до безвредных фосфат-ионов по сравнению с контролем — стерильной средой. Такой показатель эффективности метода (см. рисунок).

До сих пор это первый в мире описанный пример включения белого фосфора в биосферный круговорот фосфора.

Литература

1. Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L. et al. Toxicological profile for white phosphorus // U. S. Department of Health and Human Services. USA. 1997. P. 248.

2. Миндубаев А. З., Бабынин Э. В., Бадеева Е. К. и др. Биологическая деградация жёлтого (белого) фосфора — вещества первого класса опасности // Журнал неорганической химии. 2021. Т. 66, № 8. С. 1137–1142.

3. Брехова Л. И., Стахурлова Л. Д. Методы количественного анализа удобрений: учеб.-метод. пособие для вузов. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2006. С. 39.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-147

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO CORYLUS PONTICA* K. KOCH [*]

FEATURES OF INTRODUCTION INTO CULTURE *IN VITRO* OF *CORYLUS PONTICA* K. KOCH

Г. А. Цатурян

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр РАН», Сочи

G. A. Tsaturyan

Federal Research Centre "Subtropical Scientific Centre RAS", Sochi

✉ grisha.tsaturyan@yandex.ru

Аннотация

Одной из перспективных культур для Краснодарского края и России является фундук (*Corylus pontica* K. Koch). Однако для достижения высоких урожаев и коммерческого успеха необходимо расширить ареал распространения этой культуры, а соответственно, и площади. С целью увеличения производства орехов для закладки плантаций необходимо применять оздоровленный высококачественный посадочный материал, выращенный с использованием современных биотехнологических методов.

Abstract

One of the promising crops for the Krasnodar Territory and Russia is hazelnut (Corylus pontica K. Koch). However, to achieve high yields and commercial success, it is necessary to expand the range of this crop, respectively, and the area. In order to increase the production of nuts for planting, it is necessary to use healthy high-quality planting material grown using modern biotechnological methods. In this work, the effects of sterilizing substances on the viability of Corylus pontica K. Koch explants were studied.

Фундук принадлежит к отряду букоцветных (Fagales), семейству березовых (Betulaceae), подсемейству Coryloideae, роду *Corylus* L., произрастает в умеренных зонах северного полушария Европы, Малой Азии и Северной Америки [1]. В настоящее время всего насчитывается около 17 видов фундука. Название рода фундука *Corylus* происходит от греческого слова korylos, что означает «орех» или «лесной орех» [2]. История культивирования фундука (*Corylus pontica* K. Koch) в России тесно связана с черноморским побережьем Кавказа, благоприятным для этой культуры является климат влажных субтропиков. Коллекция фундука Субтропического научного центра РАН насчитывает около 35 сортов. С целью увеличения производства орехов для закладки плантаций необходимо применять оздоровленный высококачественный посадочный материал, выращенный с использованием современных биотехнологических методов [3]. Размножение в *in vitro* является наиболее распространенным методом пролиферации для многих видов орехоплодных культур [4].

Цель исследований — изучение влияния сроков отбора и стерилизующих веществ на жизнеспособность эксплантов *Corylus pontica* K. Koch.

Объектами исследования послужили побеги фундука из коллекции ФИЦ СНЦ РАН (г. Сочи). В работе использовали методы клонального микроразмножения, основанные на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений.

В результате изучения сроков отбора эксплантов фундука для введения в стерильную культуру нами установлено, что лучшим был весенний период (апрель — май). Выявлено, что в этот период у сортов фундука развитие эксплантов в среднем для культуры составило 13,3–16 % (молодые побеги), а в марте только 8,5 % (почки). При этом отмечены сортовые особенности, так, наименьшие показатели регенерации морфогенных процессов наблюдали у сортов Ламберта крупнолистный и Бомба. В то же время наибольшее количество развивающихся эксплантов наблюдалось у сорта Трапезунд (IV — 21,1 %; V — 24,3 %).

При отработке протокола введения в культуру *in vitro* эксплантов также важное значение имеют условия их стерилизации. Так, из 12 изученных нами вариантов стерилизации на 7 получены результаты, которые приведены на рис. 3. Наибольший процент жизнеспособных эксплантов сортов Трапезунд (40 %) и Бомба (22,7 %) был получен при стерилизации 96%-м спиртом 1 мин и 0,05%-й сулемой 10 мин. При этом для Ламберта краснолистного лучшие результаты стерилизации отмечены на варианте с обработкой эксплантов 96%-м спиртом 1 мин и 0,05%-й сулемой 18 мин.

[*] Исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ «Субтропический научный центр РАН» № GRW-2024-0008, рег. № 1023110900223-6-4.1.1.

© Г. А. Цатурян, 2025

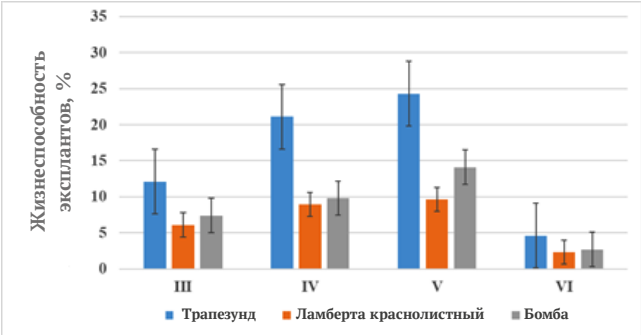


Рис. 1. Влияние сроков отбора на выход жизнеспособных эксплантов фундука

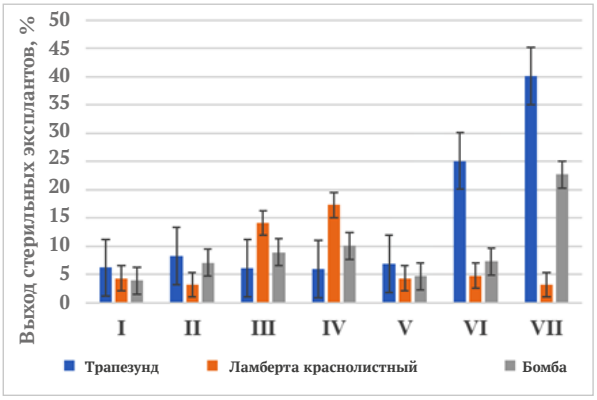


Рис. 3. Влияние стерилизующих веществ и их экспозиций на выход стерильных эксплантов, %



Рис. 2. Индукция органогенеза из почек (*а*) и побегов с пазушными почками (*б*) фундука сорта Трапезунд



Рис. 4. Единичный спонтанный ризогенез у микропобегов сорта Трапезунд

В результате культивирования на питательной среде МС через 55 суток у микропобегов сорта Трапезунд отмечен спонтанный ризогенез (рис. 4).

Таким образом, было установлено, что сроком отбора эксплантов фундука для введения в стерильную культуру является весенний период (апрель — май). Выявлено, что в этот период у сортов фундука развитие эксплантов в среднем для культуры составило 13,3–16 % (молодые побеги), а в марте только 8,5 % (почки). Также определен оптимальный состав стерилизующих веществ и их экспозиций (спирт этиловый 96 % 1 мин и сулема 0,05 % 10 мин).

Литература

1. Bruno L., Gabriele C., Lorenzo V., Daniela F. Climatic suitability of different areas in Abruzzo, Central Italy, for the cultivation of hazelnut // Horticulturae. 2022. Vol. 8. P. 580.

2. Roberto B., Thomas J., Erdogan M. V., Valentini N. Hazelnut (Corylus spp.) breeding. 2020. P. 157–219.

3. Махно В. Г., Тутберидзе Ц. В., Беседина Т. Д. Характеристика сортов фундука нового поколения в коллекции ФИЦ СНЦ РАН // Субтропическое и декоративное садоводство. 2020. Т. 75. С. 21–27.

4. Withers L. A. In vitro collecting: concept and background, in vitro collecting techniques for germplasm conservation // Rome. 2002. P. 6–2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-148

ЭКЗОСОМЫ РАСТЕНИЯ *NICOTIANA TABACUM* В КАЧЕСТВЕ НАНОПЛАТФОРМЫ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ МИКРОРНК

EXOSOMES OF THE NICOTIANA TABACUM PLANT AS A NANO-PLATFORM FOR TARGETED DELIVERY OF MICRORNA

Ж. Л. Цыденешиева, Ю. А. Югай, Ю. Н. Шкрыль

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток

Z. L. Tsydeneshieva, Y. A. Yugay, Y. N. Shkryl

Federal Scientific Center of Terrestrial Biodiversity of East Asia FEB RAS, Vladivostok

✉ zhargalma2509@gmail.com

Аннотация

Экзосомы растительного происхождения представляют собой небольшие внеклеточные везикулы, способные к транспортировке различных клеточных биомолекул и в данный момент рассматриваются в качестве перспективных наноплатформ доставки и регуляции генов. В данном исследовании мы сообщаем о биоинженерии трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*), экспрессирующих искусственные микроРНК (амиРНК), предназначенные для нацеливания на зеленый флуоресцентный белок (GFP). Экзосомы были выделены из листьев этих трансгенных растений табака, и их способность накапливать амиРНК была подтверждена путем выделения и количественного определения РНК. Примечательно, что эти экзосомы были способны проникать в клетки табака, экспрессирующие GFP, что приводило к значительному подавлению экспрессии GFP, что было продемонстрировано с помощью флуоресцентной микроскопии и количественной ПЦР. Это первая демонстрация использования биоинженерных растительных экзосом в качестве системы адресной доставки амиРНК для регулирования экспрессии специфических генов *in planta*. Полученные нами результаты подчеркивают потенциал растительных экзосом как эффективных транспортных средств для ингибирования экспрессии генов, предлагая новый подход к точной регуляции генов в растениях и платформу для будущих биотехнологических применений в улучшении сельскохозяйственных культур и терапии на основе растений.

Abstract

Plant-derived exosomes are small extracellular vesicles with the potential to serve as natural carriers for biomolecules, offering promising applications in gene delivery and regulation. In this study, we report the bioengineering of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants expressing artificial microRNAs (amiRNAs) designed to target green fluorescent protein (GFP). Exosomes were isolated from the leaves of these transgenic tobacco plants, and their ability to accumulate amiRNAs was confirmed through RNA extraction and quantification. Notably, these exosomes were capable of penetrating into tobacco cells expressing GFP, resulting in a significant suppression of GFP expression, as demonstrated by fluorescence microscopy and quantitative PCR. This is the first demonstration of bioengineered plant exosomes being used as a targeted delivery system for amiRNAs to regulate specific gene expression *in planta*. Our findings highlight the potential of plant exosomes as efficient vehicles for gene silencing, offering a novel approach to precise gene regulation in plants and a platform for future biotechnological applications in crop improvement and plant-based therapies.

Экзосомы представляют собой липидные везикулы размером от 30 до 150 нм, которые секретируются различными типами клеток во внеклеточную среду. Эти везикулы происходят из эндосомального компартмента и способны к транспортировке различных молекул внутри клетки, включая белки, липиды, метаболиты и нуклеиновые кислоты [1]. Предыдущие исследования показали, что растительные экзосомы могут переносить микроРНК (миРНК) и передавать их между клетками (Ref) [2]. МикроРНК — это малые некодирующие РНК, которые играют важнейшую роль в посттранскрипционной регуляции генов, нацеливая определенные мессенджерные РНК (мРНК) на деградацию или трансляционную репрессию. Чтобы проверить возможность использования растительных экзосом в качестве средств доставки амиРНК, мы разработали систему доказательства концепции с использованием сконструированных амиРНК, направленных на глушение экспрессии зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

В данном исследовании мы сначала сконструировали трансгенные растения *Nicotiana tabacum* для экспрессии искусственных микроРНК (амиРНК), нацеленных на экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP) и заглушающих ее. Для подтверждения успешной трансформации растений табака с конструкцией amiRNA мы

© Ж. Л. Цыденешиева, Ю. А. Югай, Ю. Н. Шкрыль, 2025

провели анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР) на геномной ДНК, выделенной из устойчивых к канамицину растений (рис. 1).



Рис. 1. Контрольные (*а*) и трансгенные (*б*) растения *Nicotiana tabacum*; сравнение экспрессии гена *ntpII* (*в*) в трансгенных (Nt-amiRNA_GFP) и контрольных (Wt) растениях

Экзосомы выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования. Выделяли из контрольных растений табака дикого типа (ТЭВ — внеклеточные везикулы табака), а также из растений трансгенных линий (ТТЭВ — внеклеточные везикулы трансгенного табака с GFP). Анализ отслеживания наночастиц (NTA) показал, что средний диаметр ТЭВ составлял 177 ± 17 нм (рис. 2, *б*), а ТТЭВ — 142 ± 12 нм (см. рис. 2, *а*). Концентрация выделенных экзосом составила 2,2 × 10^{11} и 3,6 × 10^{11} частиц/мл для ТЭВ и ТТЭВ соответственно. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) подтвердила наличие интактных сферических везикул, размер и структурная целостность которых оставались стабильными в разных образцах (см. рис. 2, *б, г*).

В данном исследовании мы попытались выяснить, накапливают ли экзосомы, полученные из трансгенных растений табака, амиРНК, нацеленные на GFP. Поскольку миРНК из экзосом растений табака ранее не были охарактеризованы, мы использовали гомологичные миРНК *Arabidopsis thaliana*, которые, как известно, специфически накапливаются в экзосомах, в качестве внутреннего контроля для нашего анализа. Такие представители, как *miR167a*, *miR168a*, которые ранее были определены как наиболее многочисленные виды в секретируемой фракции экзосом из сока винограда [3], были проанализированы. С помощью qPCR мы определили способность экзосом *N. tabacum* к накоплению маркерных экзосомальных микроРНК (рис. 3)

Для оценки снижения флюоресценции, опосредованной экзосомами, использовали протопласты трансгенных растений с геном GFP. Протопласты обрабатывали экзосомами, полученными из трансгенных растений, содержащих амиРНК, нацеленные на GFP (ТТЭВ). Экзосомы, выделенные из нетрансгенных растений (ТЭВ), служили контролем. В протопластах, обработанных ТТЭВ, наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции GFP, что было подтверждено с помощью конфокальной микроскопии.

Конфокальная визуализация выявила снижение флуоресценции GFP в протопластах, обработанных ТТЭВ, через 30 мин инкубации, которое продолжалось в течение следующих 30 мин. В то же время флуоресценция GFP протопластов, обработанных ТЭВ, оставалась относительно стабильной в течение этого периода. Интересно, что через 90 мин инкубации флуоресценция GFP в протопластах, обработанных ТТЭВ, вернулась к исходному уровню. Однако к 120-й минуте было обнаружено заметное снижение флуоресценции как в ТТЭВ-, так и в ТЭВ-обработанных протопластах (рис. 4).

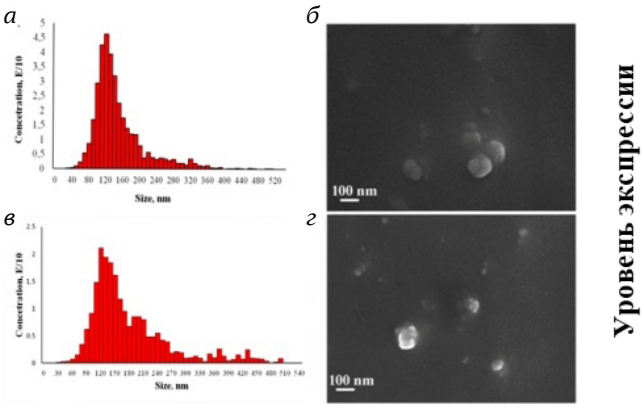


Рис. 2. Анализ отслеживания наночастиц (*а, в*), изображения сканирующей электронной микроскопии (*г, б*) ТЭВ и ТТЭВ

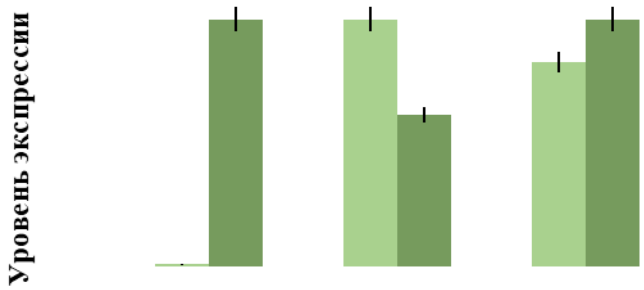


Рис. 3. График уровня экспрессии микроРНК в ТЭВ и ТФЭВ

Таким образом, обработка трансгенных протопластов ТТЭВ приводила к динамической модуляции флуоресценции GFP во времени. Эти результаты подчеркивают потенциал экзосом растительного происхождения в качестве векторов для доставки РНК и глушения генов в растительных клетках.

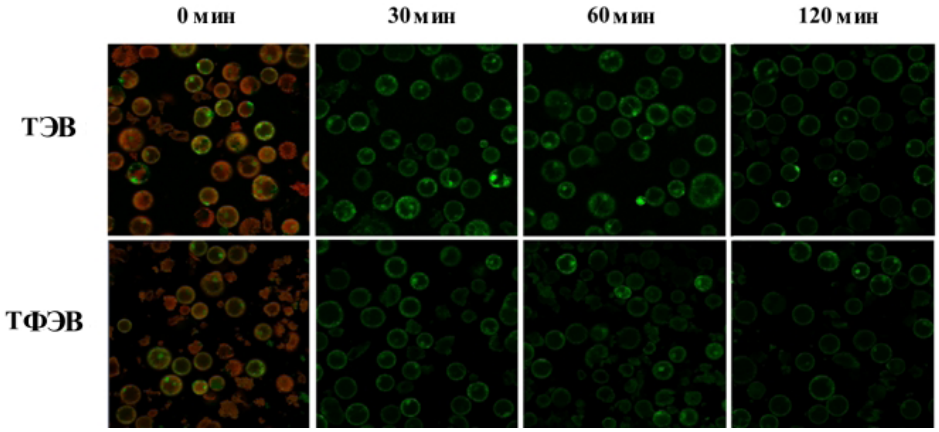


Рис. 4. Конфокальная флуоресцентная микроскопия протопластов трансформированного растения *N. tabacum*, экспрессирующего флуоресцентный белок GFP, под воздействием двух типов экзосомальных везикул: выделенных из растения *N. tabacum* дикого типа (ТЭВ) и трансгенного растения *N. tabacum*, экспрессирующего амиРНК GFP (ТТЭВ)

Литература

1. Regente M., Pinedo M., Elizalde M., de la Canal L. Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants? // Plant Signal. Behav. 2012. No. 7. P. 544–546.

2. Baldrich P., Rutter B. D., Karimi H. Z. et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10- to 17-nucleotide “tiny” RNAs // Plant Cell. 2019. No. 31. P. 315–324.

3. Ju S., Mu J., Dokland T. et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis // Mol. Ther. 2018. No. 21. P. 1345–1357.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-149

СРАВНЕНИЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ И ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ МИЦЕЛИЯ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ *LENTINULA EDODES* (ШИИТАКЕ) И *FLAMMULINA VELUTIPES* (ЭНОКИТАКЕ) ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *

COMPARISON OF THE ANTITHROMBOTIC ACTIVITY OF CULTURE FILTRATES AND AQUEOUS MYCELIUM EXTRACTS OF BASIDIOMYCETES *LENTINULA EDODES* (SHIITAKE) AND *FLAMMULINA VELUTIPES* (ENOKITAKE) DURING SUBMERGED CULTIVATION

В. С. Чернышенко[1], Н. М. Фаустова[1], Ю. В. Дадали[1], М. Н. Макарова[1], Д. Н. Ведерников[2], Н. В. Псурцева[3]

[1]АО «Научно-производственное объединение „Дом Фармации“», Ленинградская область
[2]Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С. М. Кирова
[3]Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

V. S. Chernyshenko[1], N. M. Faustova[1], Y. V. Dadali[1], M. N. Makarova[1], D. N. Vedernikov[2], N. V. Psurtseva[3]

[1]Research and Manufacturing Company “Home of Pharmacy” JSC, Leningrad Oblast
[2]Saint Petersburg State Forestry Engineering University named after S. M. Kirov
[3]V. L. Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg

✉ chernyshenko.vs@doclinika.ru

Аннотация

Исследование посвящено *in vitro* сравнению антитромботической активности биологически активных соединений водных экстрактов мицелия и культуральных фильтратов штаммов *Lentinula edodes* и *Flammulina velutipes,* полученных при глубинном культивировании. Мицелиальные экстракты обладали более выраженным влиянием на параметры фибринолиза, чем культуральные фильтраты, и потенциально могут использоваться для разработки лекарственных препаратов.

Abstract

The study is devoted to an *in vitro* comparison of the antithrombotic activity of biologically active compounds of aqueous extracts of mycelium and cultural filtrates of strains *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes* obtained by submerged cultivation. Mycelial extracts had a more pronounced effect on fibrinolysis parameters than cultural filtrates, and could potentially be used for drug development.

Грибы являются ценным источником разнообразных биологически активных веществ (БАВ) [1]. По литературным данным компоненты, содержащиеся в водных экстрактах, полученных из грибов *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (шиитаке) и *Flammulina velutipes* (Curtis) Signer (энокитаке, опенок зимний), обладают антитромбической активностью [2] и представляют интерес как сырье для получения биологически активных добавок и лекарственных препаратов.

БАВ, полученные из контролируемых источников, имеют преимущество перед природными с точки зрения воспроизводимости их качества. Культуральные фильтраты, полученные в процессе глубинного культивирования, содержат аналогичные БАВ, которые накапливают грибы в природных условиях [3].

Цель исследования — оценка и сравнение антитромботических свойств БАВ, содержащихся в культуральных фильтратах и водных экстрактах из мицелия двух видов грибов.

Материалы и методы

Объекты исследования — культуральные фильтраты (КФ) и водные экстракты из мицелия (ВЭМ) штаммов *L.edodes* LE-BIN 0404 и *F. velutipes* LE-BIN 0385 из Коллекции культур базидиомицетов БИН РАН [4].

Посевной материал выращивали стационарно при 24 ± 2 °С в колбах с фарфоровыми бусами в жидкой среде, содержащей солодовый экстракт (плотность по сахару 4 %). После зарастания поверхности колбы мицелий разбивали встряхиванием и переносили в колбы с глюкозо-пептонной средой в количестве 10 % от объема среды. Культивирование штаммов проводили на шейкере-инкубаторе Innova 44R (New Brunswick) при 25 °С и 180 об/мин; образцы отбирали через 7, 10 и 14 суток от начала культивирования. После отбора КФ фильтровали,

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-26-00345).
© В. С. Чернышенко, Н. М. Фаустова, Ю. В. Дадали, М. Н. Макарова, Д. Н. Ведерников, Н. В. Псурцева, 2025

мицелий промывали водой очищенной и высушивали на воздухе при комнатной температуре, измельчали и экстрагировали водой два раза в соотношении 1 : 9 и затем 1 : 1.

Для *in vitro* оценки антитромботической активности исследовали влияние КФ и ВЭМ на следующие параметры: активацию плазминогена, активность α2-антиплазмина, изменение содержания фибриногена, фибринолитическую активность плазмы крови. Анализ выполняли с использованием коммерчески доступной референтной нормальной пулированной плазмы крови человека и наборов реагентов: XIIa-зависимый фибринолиз, № ФА-1; Реахром-плазминоген, № ФА-2; Реахром-антиплазмин, № ФА-3 (НПО «РЕНАМ», Россия); Тех-Фибриноген-тест, № 94 (ООО «Технология-Стандарт», Россия) [2].

Результаты

Выделенные экстракты оказывали влияние на все изученные параметры (см. таблицу), экстракт *F. velutipes* в большей степени влиял на концентрацию фибриногена. Причем экстракты из опенка зимнего повышали фибринолитическую активность плазмы крови, а из шиитаке — снижали ее.

Результаты оценки влияния на параметры фибринолиза КФ и ВЭМ грибов

Параметры*	T**, сут	Вид и тип материала			
		L. edodes		*F. velutipes*	
		КФ	ВЭМ	КФ	ВЭМ
Активация плазминогена	7	–***	↑ 16 %	–	↑ 31 %
	10	–	–	–	↑ 17 %
	14	–	–	–	–
Активность α2-антиплазмина	7	–	–	↓ 43 %	↓ 22 %
	10	↓**** 29 %	↑ 24 %	–	–
	14	↓ 32 %	–	↓ 17 %	–
Концентрации фибриногена	7	–	↓ 45 %	–	↓ 61 %
	10	–	↓ 18 %	–	↓ 84 %
	14	–	–	–	↓ 85 %
Фибринолитическая активность	7	–	↑ 48 %	–	↑ 35 %
	10	↓ 15 %	↑ 47 %	–	↑ 29 %
	14	↓ 27 %	↑ 73 %	–	–

Примечание:
* изменения параметров в % по отношению к контрольному образцу;
** день съема образца;
*** влияние отсутствует или менее ± 15 %;
**** увеличение/активирование или уменьшение/ингибирование эффекта.

В КФ влияние на параметры фибринолиза было выраженно в меньшей степени, что может быть связано с неоптимальными условиями культивирования и низкой концентрацией БАВ, влияющих на изучаемые параметры.

Заключение

Водные экстракты мицелия *L. edodes* и *F. velutipes* потенциально могут использоваться как сырье для разработки антитромботических препаратов или функциональных продуктов питания. Различия в активности между экстрактами из мицелия и культуральными фильтратами указывают на необходимость подбора оптимальных условий культивирования и выяснения природы активных соединений.

Литература

1. Yadav D., Negi P. S. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits // Food Res. Int. 2021.

2. Фаустова Н. М., Ведерников Д. Н., Баканов В. В. и др. Влияние *in vitro* на параметры фибринолиза водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2024. Т. 13 (2). С. 217–232.

3. Вассер С. П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». 2015. Т. 7 (2). С. 238–248.

4. Psurtseva N. V., Kiyashko A. A., Gachkova E. Y., Belova N. V. Basidiomycetes Culture Collection LE (BIN): Catalogue of Strains. M., SPb: KMK Scientific Press Ltd, 2007. P. 116.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-150

ПРОДУКТИВНОСТЬ *APIS MELLIFERA* L. В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

PRODUCTIVITY OF *APIS MELLIFERA* L. IN THE VOLGA FEDERAL DISTRICT

Н. Д. Шамаев[1–3], Э. А. Шуралев[1,3,4], Е. С. Кошпаева[2], К. В. Сычев[1,2], М. Н. Мукминов[1,3]

[1]*Казанский (Приволжский) федеральный университет*
[2]*Казанский государственный медицинский университет*
[3]*Казанская государственная медицинская академия*
[4]*Казанский государственный аграрный университет*

N. D. Shamaev[1–3], E. A. Shuralev[1,3,4], E. C. Koshpayeva[2], K. V. Sychev[1,2], M. N. Mukminov[1,3]

[1]*Kazan Federal University*
[2]*Kazan State Medical University*
[3]*Kazan State Medical Academy*
[4]*Kazan State Agrarian University*

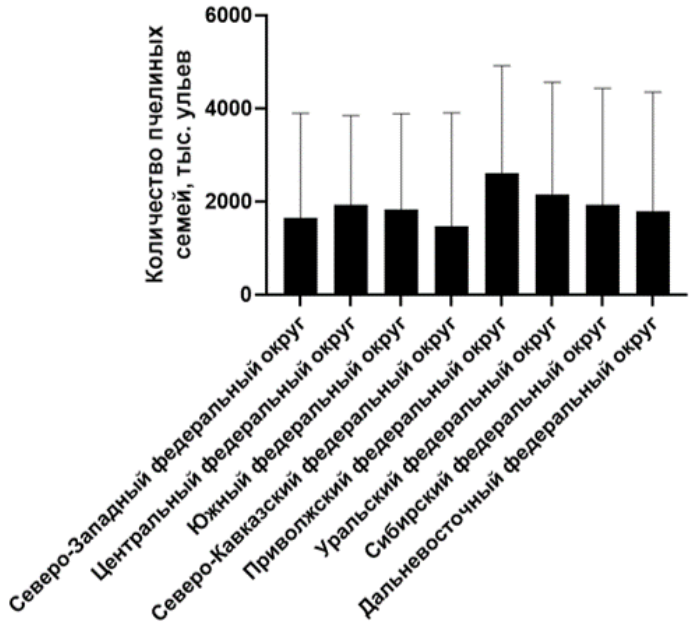
✉ nikolai.shamaev94@mail.ru

Аннотация

Республика Татарстан, имея приблизительно 9,2 тыс. пчелиных семей, занимает первое место в Приволжском федеральном округе по количеству пчелиных семей за последние 35 лет. По сравнению с другими регионами Республика Татарстан обладает ограниченными медовыми ресурсами, несмотря на то что опыляет до 90 % энтомофильных сельскохозяйственных культур.

Abstract

With approximately 9,200 thousand bee colonies, the Republic of Tatarstan leads the Volga Federal District in terms of bee colonies over the past 35 years. In comparison to other locations, Republic of Tatarstan has a limited honey resource, even though it pollinates up to 90 % of entomophilous agricultural crops.



Численность пчелиных семей в восьми федеральных округах Российской Федерации

Согласно данным исследователей [1] и данным Федеральной службы государственной статистики [2], самое большое количество пчелиных семей за 35 лет (с 1990 по 2025 г.) находится в Приволжском федеральном округе (см. рисунок). Среди медоносных хозяйств Приволжского федерального округа лидирующие позиции занимают Республика Татарстан (9200 тыс.), Республика Удмуртия (9400 тыс.) и Республика Чувашия (9700 тыс.). Учитывая, что медоносные пчелы *Apis mellifera* L. опыляют до 90 % энтомофильных сельскохозяйственных культур, примечателен невысокий медоносный запас Республики Татарстан по сельскохозяйственным площадям (лесные площади 69,3 %; сельскохозяйственные площади 24,9 %; сенокосы и пастбища 5,8 %) [3] в сравнении с Республикой Удмуртия (лесные площади 46 %; сельскохозяйственные площади 43,7 %; сенокосы и пастбища 10,3 %) [4, 5] и Республикой Чувашия (лесные площади 32 %; сельскохозяйственные площади 56,7 %; сенокосы и пастбища 11,3 %) [6–8]. По данным на 2022–2024 гг., количество произведенного

© Н. Д. Шамаев, Э. А. Шуралев, Е. С. Кошпаева, К. В. Сычев, М. Н. Мукминов, 2025

меда в Республике Татарстан находится на уровне 3,7 тыс. тонн, в сравнении с 849 тоннами в Республике Удмуртия [9, 10].

Исходя из этого, вполне вероятно, что в Республике Татарстан, обеспечивающей ресурсы для пчел, меньшее количество семей может собирать сравнительно больше нектара и, следовательно, производить больше меда. В связи с этим для предотвращения снижения опылительной деятельности медоносной пчелы в Республике Татарстан одним из важных условий является изучение негативных факторов, связанных с заболеваниями медоносной пчелы.

Литература

1. Frunze O., Brandorf A., Kang E.-J., Choi Y.-S. Beekeeping genetic resources and retrieval of honey bee Apis mellifera L. stock in the Russian Federation: a review // Insects. 2021.

2. Число семей пчел медоносных в хозяйствах всех категорий // Федеральная служба государственной статистики. URL: https://rosstat.gov.ru/opendata/7708234640-VSHP2016553 (дата обращения: 26.07.2025).

3. В Казани прошел «Форум пчеловодов Поволжья — 2024» // Журнал «Сельскохозяйственные Вести». URL: https://agri-news.ru/novosti/v-kazani-proshel-forum-pchelovodov-povolzhya-2024/ (дата обращения: 26.07.2025).

4. Удмуртская республика // Национальное информационное агентство «Природные ресурсы». URL: http://www.priroda.ru/ (дата обращения: 26.07.2025).

5. Удмуртская Республика. Хозяйство. Сельское хозяйство // Научно-образовательный портал «Большая российская энциклопедия». URL: https://bigenc.ru/c/udmurtiia-khoziaistvo-sel-skoe-khoziaistvo-cb64e2 (дата обращения: 26.07.2025).

6. Лесные ресурсы // Министерство природных ресурсов и экологии Чувашской Республики. URL: https://minpriroda.cap.ru/action/activity/lesnie-resursi-(banner) (дата обращения: 26.07.2025).

7. Чувашская республика // Национальное информационное агентство «Природные ресурсы». URL: http://www.priroda.ru/ (дата обращения: 26.07.2025).

8. ФГБУ «Управление «Чувашмелиоводхоз» // Информационный портал ФГБНУ ВНИИ «Радуга». URL: https://inform-raduga.ru/fgbu/108 (дата обращения: 26.07.2025).

9. 849 тонн меда произвели в Удмуртии за 2022 год // Сетевое издание Udm-info. URL: https://udm-info.ru/news/2023-08-15/849-tonn-meda-proizveli-v-udmurtii-za-2022-god-3013194 (дата обращения: 26.07.2025).

10. В Минсельхозе Чувашии прошло совещание по развитию пчеловодства // Газета «Советская Чувашия». URL: http://sovch.chuvashia.com/?p=279560 (дата обращения: 26.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-151

БАЙКАЛЬСКИЕ ОКСИФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ — ИСТОЧНИКИ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ*

BAIKAL OXYPHILIC MICROORGANISMS — SOURCES OF NATURAL ANTIOXIDANTS FOR THE CORRECTION OF MALE INFERTILITY

В. Н. Шелковникова, М. Е. Дмитриева, А. А. Баталова, Т. Ю. Тельнова, А. Ю. Белышенко, Е. В. Малыгина, Н. А. Имидоева, О. Е. Липатова, Д. В. Аксёнов-Грибанов

Иркутский государственный университет

V. N. Shelkovnikova, M. E. Dmitrieva, A. A. Batalova, T. Y. Telnova, A. Y. Belyshenko, E. V. Malygina, N. A. Imidoeva, O. E. Lipatova, D. V. Axenov-Gribanov

Irkutsk State University

✉ shelkovnikova551@gmail.com

Аннотация

Исследован антиоксидантный потенциал оксифильных микроорганизмов из озера Байкал для разработки новых средств против мужского бесплодия. Выделено 20 штаммов *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Flavobacterium* и *Bacillus*, синтезирующих антиоксиданты. Показано положительное влияние экстрактов на подвижность сперматозоидов. Результаты открывают перспективы создания препаратов против окислительного стресса.

Abstract

The antioxidant potential of microorganisms isolated from Lake Baikal has been explored for the development of innovative treatments for male infertility. A total of twenty strains of *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Flavobacterium*, and *Bacillus* that synthesize antioxidants have been identified. Extracts from these microorganisms have demonstrated a positive impact on sperm motility, paving the way for the creation of treatments to combat oxidative stress in men.

Область репродуктивной биологии тесно связана с проблемами окислительного стресса. По данным ВОЗ, бесплодие — глобальная проблема, затрагивающая 186 млн человек. В России лечение мужского бесплодия часто ограничено применением БАД. Недостаток исследований в этой области обостряет необходимость поиска новых природных антиоксидантов. Озеро Байкал, воды которого насыщены кислородом, служит уникальной средой обитания оксифильных микроорганизмов, потенциально синтезирующих антиоксиданты. Целью проекта была оценка антиоксидантного потенциала данных штаммов.

Пробоотбор проводили в зонах с содержанием кислорода с 9,97 до 21,4 мг/л. Идентификацию микроорганизмов выполняли по гену 16S рРНК. Антиоксидантную активность оценивали методом DPPH, биотехнологический потенциал — с применением подходов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС. Оценку влияния экстрактов на сперматозоиды проводили с использованием микроскопа и специализированного ПО при концентрациях 10, 5 и 2 мг/мл после 1, 3 и 6 ч инкубации при 37 °C.

Было выделено 20 штаммов родов *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Flavobacterium* и *Bacillus*, обладающих антиоксидантной активностью. *Bacillus* sp. 2021M9 синтезировал 27 соединений, включая антиоксиданты N-Acetyl-4-hydroxybenzylamine и Arzanol. *Flavobacterium* sp. 2021M5 синтезировал не менее 42 соединений, в том числе Norplicacetin. *Janthinobacterium* sp. 2021M8 — не менее 34 соединений, включая 16-Deethylindanomycin и 8-Methylpentadecanoic acid. Штамм *Bacillus* sp. 2021M21 синтезировал не менее 12 соединений, в том числе антибактериальное соединение Antibiotic SF 2771. Также стоит отметить, что представленные штаммы *Flavobacterium* sp. 2021M5, *Janthinobacterium* sp. 2021M8, *Bacillus* sp. 2021M9 и *Bacillus* sp. 2021M21 синтезировали антиоксидант Maculosin 1. По данным ГХ-МС, штаммы также синтезировали антиоксиданты Hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, 3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione и N-Acetyltyramine. Было показано, что экстракт *Bacillus* sp. 2021M9 в концентрациях 2 и 5 мг/мл оказывал

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FZZE-2024-0003.

© В. Н. Шелковникова, М. Е. Дмитриева, А. А. Баталова, Т. Ю. Тельнова, А. Ю. Белышенко, Е. В. Малыгина, Н. А. Имидоева, О. Е. Липатова, Д. В. Аксёнов-Грибанов, 2025

положительное влияние на увеличение процента подвижных сперматозоидов, локальную подвижность и способствовал повышению прямолинейности движения. Экстракт *Janthinobacterium* sp. 2021M8 в концентрации 2 мг/мл повышал подвижность и прямолинейную скорость сперматозоидов.

Эксперимент показал, что байкальские микроорганизмы синтезируют антиоксиданты, которые могут быть использованы для создания лекарств от заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-152

НОВЫЙ КЛАСС ОРГАНИЧЕСКИХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ СОПРЯЖЕННЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ РАКА *

A NEW CLASS OF ORGANIC PHOTOSENSITIZERS BASED ON CONJUGATED POLYMERS FOR EFFECTIVE CANSER THERAPY

А. А. Шумицкая[1,2], Е. Д. Благодарная[2], Ю. А. Исаева[2,3], Р. А. Акасов[3], Ю. Н. Лупоносов[2]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Институт синтетических полимерных материалов им. Н. С. Ениколопова РАН, Москва*
[3] *Московский педагогический государственный университет*

A. A. Shumitskaya[1,2], E. D. Blagodarnaia[2], Yu. A. Isaeva[2,3], R. A. Akasov[3], Y. N. Lyponosov[2]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials RAS, Moscow*
[3] *Moscow Pedagogical State University*

✉ a.shumickaya@ispm.ru

Аннотация

В работе исследованы новые наночастицы (НЧ) на основе сопряженных полимеров (СП) Y-серии и их мономеров в качестве потенциальных агентов для фототерапии рака. Исследование фототоксичности *in vitro* показало повышенную эффективность НЧ на основе СП по сравнению с НЧ мономеров, что делает их перспективными кандидатами для дальнейшей разработки фототерапевтических препаратов.

Abstract

This study investigates new nanoparticles (NPs) based on Y-series conjugated polymers (CPs) and their monomers as potential agents for cancer phototherapy. *In vitro* phototoxicity studies showed that CP-based NPs were more effective than monomer NPs, making them promising candidates for the further development of phototherapeutic drugs.

Одним из ключевых направлений современной онкотерапии является разработка неинвазивных, селективных и эффективных методов лечения рака. Фототерапия (ФТ), основанная на использовании фотосенсибилизаторов (ФС) и электромагнитного излучения определенного диапазона, зарекомендовала себя как безопасный и минимально инвазивный подход к терапии злокачественных новообразований. Важным условием для успешной реализации ФТ является использование биосовместимых и селективных ФС с поглощением в терапевтически значимых диапазонах — красном (650–800 нм) и ближнем инфракрасном (БИК, 1000–1400 нм), что обеспечивает глубокое проникновение излучения в ткани и высокую селективность действия.

Наиболее перспективным новым классом ФС, отвечающих этим требованиям, являются органические сопряженные полимеры (СП) донорно-акцепторного (Д-А) типа. Благодаря наличию в их структуре как электронодонорных (Д), так и электроноакцепторных (А) фрагментов, можно тонко настраивать оптические свойства и фотофизические характеристики таких молекул за счет структурных модификаций. Такие материалы обладают способностью эффективно генерировать активные формы кислорода (АФК), обеспечивать визуализацию биомолекул и клеток, вызывать гипертермию опухолевых клеток, благодаря чему демонстрируют высокую фототоксичность при минимальных концентрациях [1]. Кроме того, такие материалы образуют стабильные наночастицы (НЧ) в воде, что позволяет получать многофункциональные наноматериалы с таргетной доставкой и возможностью комбинированной терапии.

В данной работе были получены и систематически исследованы НЧ органических Д-А-молекул: 2 мономера и 4 СП на основе 10,11-дигидро-[1,2,5]тиадиазоло[3,4-e]тиено[2′,3′:4,5]пирроло[3,2-g]тиено[3,2-b]-индола. Данные молекулы относятся к полупроводникам Y-серии, которые уже успешно применяются в органической электронике [2]. Эти материалы обладают высокой фотостабильностью, широким спектральным диапазоном поглощения и возможностью мультимодального применения, в том числе в биомедицинских приложениях. Размеры и оптические свойства дисперсий были изучены методами динамического светорассеяния и абсорбционной спектроскопии. Средние гидродинамические диаметры частиц варьировались в диапазоне 21,3–41,5 нм,

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-13-00422).
©А. А. Шумицкая, Е. Д. Благодарная, Ю. А. Исаева, Р. А. Акасов, Ю. Н. Лупоносов, 2025

что соответствует оптимальным размерам для эффективной доставки в опухолевые клетки. Максимумы поглощения находились в диапазоне 645–669 нм, что позволяет применять данные НЧ в красном терапевтическом «окне». Сравнительный анализ цитотоксичности проводился на клетках карциномы легкого человека A549 и фибробластах легких человека WI-26. Проведенное исследование продемонстрировало, что НЧ на основе СП обладают более выраженной фототоксичностью по сравнению с НЧ на основе мономеров: в среднем фототоксические индексы (ФИ) при использовании НЧ полимеров в 1,5 раза превышали ФИ для НЧ мономеров. Скорость интернализации полученных НЧ в клетках A549 количественно оценивали методом проточной цитометрии. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения и развития Д-А-полимеров Y-серии в качестве эффективных фотосенсибилизаторов для эффективной терапии рака.

Литература

1. Lu B. et al. Organic conjugated small molecules with donor-acceptor structures: design and application in the phototherapy of tumors // Materials Chemistry Frontiers. 2022. Vol. 6 (20). P. 2968–2993.

2. Liu C. et al. Recent progress in π-conjugated polymers for organic photovoltaics: solar cells and photodetectors // Progress in Polymer Science. 2023. Vol. 143. P. 101711.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-153

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОТЕРМИЧЕСКИХ АМПЛИФИКАЦИЙ С ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ *

COMPARATIVE ANALYSIS OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION AND POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA IN SALMONID FISH

Е. О. Щекутьева[1], Г. А. Бобков[1,2]

[1] Университет ИТМО, Санкт-Петербург
[2] Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

E. O. Shchekuteva[1], G. A. Bobkov[1,2]

[1] ITMO University, Saint Petersburg
[2] N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow

✉ eoshchekuteva@gmail.com

Аннотация

Рост аквакультуры сопровождается увеличением эпизоотических рисков, особенно бактериальных инфекций, вызываемых *Aeromonas spp.* и *Pseudomonas spp.* В работе проведен сравнительный анализ ПЦР, LAMP и DAMP. DAMP показал высокую чувствительность (1–10 копий) без ложноположительных результатов. Метод перспективен для портативных тестов и дальнейшей адаптации к новым мишеням.

Abstract

The growth of aquaculture is accompanied by increasing epizootic risks, particularly bacterial infections caused by *Aeromonas spp.* and *Pseudomonas spp.* This study presents a comparative analysis of PCR, LAMP, and DAMP. DAMP demonstrated high sensitivity (1–10 copies) with no false-positive results. The method is promising for portable tests and further adaptation to new targets.

По данным отчета FAO (2024), в 2022 г. мировое производство продукции аквакультуры достигло 223,2 млн т, что отражает устойчивый рост сектора на 4,4 % по сравнению с 2020 г. [1]. Однако быстрый рост сопряжен с эпизоотическими рисками: высокая плотность посадки рыбы в садках и недостаточный ветеринарный контроль способствуют распространению инфекций [2]. Бактериальные инфекции, вызываемые *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp., Flavobacterium spp.*, представляют одну из ключевых угроз для рыбных производств, занимающихся разведением лососевых рыб.

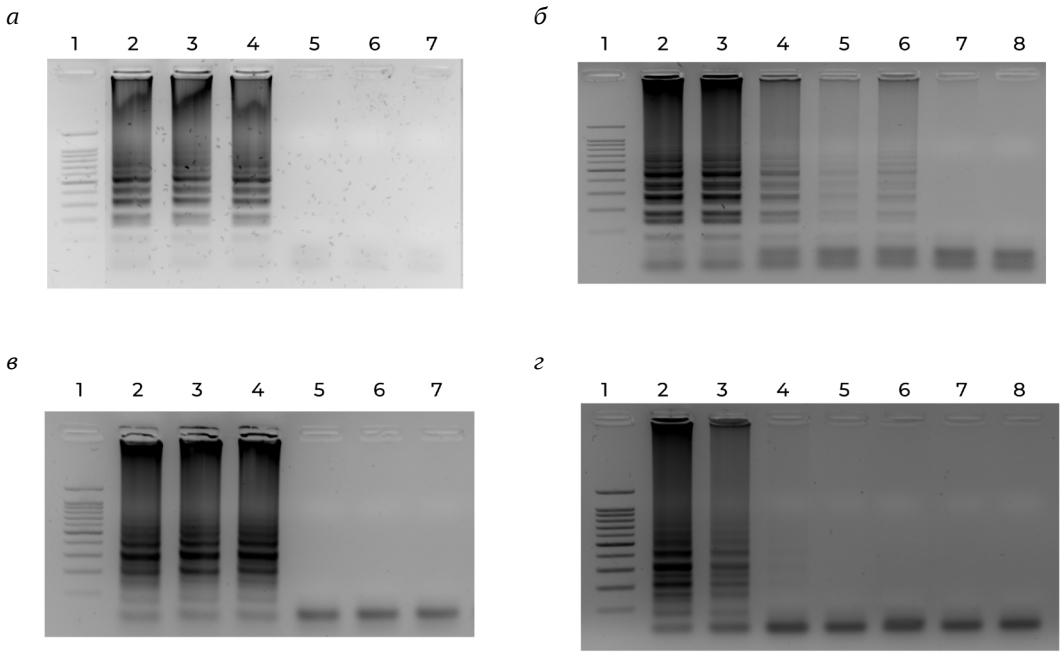
Эффективная диагностика патогенов — необходимый элемент профилактики и контроля вспышек заболеваний. Несмотря на то что полимеразная цепная реакция (ПЦР) остается золотым стандартом молекулярной диагностики, ее практическое применение ограничено высокой стоимостью оборудования, необходимостью температурных циклов и уровнем подготовки персонала. В связи с этим возрастающий интерес вызывают изотермические методы амплификации, способные функционировать при постоянной температуре и в упрощенных условиях.

Целью данного исследования стало сравнение характеристик методов ПЦР, петлевой изотермической амплификации (LAMP) [3] и ее модификации — изотермической амплификацией с двойным праймированием (DAMP) [4], по следующим параметрам: предел обнаружения (LOD), специфичность, вероятность ложноположительных результатов, длительность реакции и применимость в условиях ограниченной лабораторной инфраструктуры. В качестве мишени был выбран ген 16S рРНК бактерий *Aeromonas hydrophila* и *Pseudomonas fluorescens*.

Результаты исследования показали, что изотермические методы амплификации могут использоваться для диагностики патогенов лососевых рыб, предлагая более простую и доступную альтернативу ПЦР. Метод LAMP обеспечивал быстрое выявление и высокую чувствительность наравне с DAMP, но часто сопровождался неспецифической амплификацией даже после оптимизации реакции. Метод DAMP продемонстрировал улучшенный результат за счет модификации праймеров и отсутствия ложноположительных сигналов. Предел обнаружения при использовании метода DAMP для гена 16S рРНК бактерии *Pseudomonas fluorescens* составил 1–10 копий, для *Aeromonas hydrophila* — 100–1000 копий на 25 мкл реакции при 60 °C и временем до 45 мин (см. рисунок).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-26-00247).

© Е. О. Щекутьева, Г. А. Бобков, 2025



Изотермическая амплификация с двойным праймированием (DAMP) гена 16S рРНК *P. fluorescens* (*а, б*) и *A. hydrophila* (*в, г*); *а, в* — изотермическая амплификация: *1* — ДНК-лестница, *2–4* — результат амплификации, *5–7* — отрицательный контроль; *б, г* — лимит детекции (LOD): *1* — ДНК-лестница, *2–7* — ДНК-матрица в количестве 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 и 1 геномная копия соответственно, *8* — отрицательный контроль

Направление дальнейших исследований включает в себя оптимизацию существующих протоколов для новых мишеней, сравнительный анализ эффективности DAMP с другими изотермическими подходами (NASBA, SDA), а также разработку компактных детекционных систем, пригодных для применения вне лабораторной среды и обеспечивающих визуальное считывание результатов.

Литература

1. Ahmed I., Ishtiyaq S., Sayed S. F. An overview on understanding the major bacterial fish diseases in freshwater salmonids // Frontiers in Aquaculture. 2025. Vol. 4. P. 1515831.

2. Singh G. G., Sajid Z., Mather C. Quantitative analysis of mass mortality events in salmon aquaculture shows increasing scale of fish loss events around the world // Scientific Reports. 2024. Vol. 14, No. 1. P. 3763.

3. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic acids research. 2000. Vol. 28, No. 12. P. e63.

4. Ding X. et al. Dual-priming isothermal amplification (DAMP) for highly sensitive and specific molecular detection with ultralow nonspecific signals // Analytical chemistry. 2019. Vol. 91, No. 20. P. 12852–12858.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-154

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОКОНСТРУКЦИЙ С ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ *

ANTIPLATELET AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NANOCONSTRUCTIONS WITH LIPOIC ACID

В. А. Щелконогов[1,2], О. А. Козлова[1], А. М. Иншакова[1], Е. С. Дарнотук[1], А. В. Шипелова[1], Д. И. Прохоров[1], О. А. Баранова[2], А. В. Чеканов[2], Н. С. Шастина[1], Э. Ю. Соловьева[2], А. И. Федин[2]

[1] *Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, МИРЭА — Российский технологический университет, Москва*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*

V. A. Shchelkonogov[1,2], O. A. Kozlova[1], A. M. Inshakova[1], E. S. Darnotuk[1], A. V. Shipilova[1], D. I. Prokhorov[1], O. A. Baranova[2], A. V. Chekanov[2], N. S. Shastina[1], E. Yu. Solov'eva[2], A. I. Fedin[2]

[1] *Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA — Russian Technological University, Moscow*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

✉ vasiliy9999@yandex.ru

Аннотация

Получены наноконструкции с липоевой кислотой (ЛК) с размером частиц от 30 до 350 нм, характеризующиеся ее медленным высвобождением из наночастиц (НЧ) и высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. Показано, что НЧ с ЛК обладают выраженными антиоксидантными и антиагрегационными свойствами.

Abstract

Nanoconstructions with lipoic acid (LA) with a particle size 30–350 nm were obtained, characterized by its slow release from nanoparticles (NPs) and high stability during long-term storage at room temperature. It has been shown that NPs with LA have pronounced antioxidant and antiplatelet properties.

Цереброваскулярные заболевания являются наиболее распространенными формами патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов. К основным патогенетическим механизмам развития инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, микроциркуляторные нарушения и др. [1]. Поэтому при комплексной терапии инсульта необходимо применять препараты, проявляющие антиоксидантное и антиагрегантное действие. Одним из наиболее перспективных антиоксидантов является липоевая кислота. Однако она малорастворима в воде и, попадая в организм, быстро связывается с белками, биодеградирует, что приводит к уменьшению терапевтического действия.

Цель исследования — получение наноконструкций с ЛК для ее солюбилизации в НЧ, медленного высвобождения, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

Вначале получали наночастицы с ЛК. Лс ФХ ЛК получали пассивной загрузкой, диспергируя липидную пленку фосфатным буферным раствором (ФБР, pH 7,4) с последующей экструзией. НЭ с ЛК — методом ультразвукового диспергирования после инжекции ФБР и стабилизаторов, в органическую фазу, содержащую ЛК и ФХ. Затем удаляли органический растворитель и избыток воды при пониженном давлении.

Таким образом, были получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК и НЭ с ЛК на основе ФХ, олеоглицерина (ОГ) и плюроника Ф68, в ФБР (pH 7,4; 0,15 мМ) с размером частиц от 30 до 350 нм. НЧ с ЛК на основе Ф68 и ОГ были электронейтральными, гетерогенными и состояли из двух фракций НЧ: 30–70 нм (20 ± 5 %) и 110–310 нм (75 ± 5 %). Было показано, что НЧ с ЛК были стабильными при длительном хранении (> 3 лет) при комнатной температуре и при +4 °C.

При сравнении характеристик наноконструкций с ЛК было показано, что в НЭ удалось солюбилизировать ЛК в 1,5 раза больше по сравнению с Лс, использовав максимальную концентрацию ЛК 7 мг/мл, в то время как

* Исследование выполнено при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «Базис» (№ 22-1-1-28-1).

© В. А. Щелконогов, О. А. Козлова, А. М. Иншакова, Е. С. Дарнотук, А. В. Шипелова, Д. И. Прохоров, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, Н. С. Шастина, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, 2025

для получения липосом с ЛК использовали диапазон концентраций 1–5 мг/мл. При дальнейшем повышении количества ЛК в липосомах образовывались нестабильные дисперсии.

Методом крио-ПЭМ было обнаружено, что Лс ФХ представляют собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул сферической формы, а НЭ — систему, состоящую из однослойных и мультислойных наноструктур разного размера.

Было обнаружено, что из липосом за 24 ч высвободилось 45 ± 3 % ЛК, а из НЭ не более 55 %. Такой процесс высвобождения ЛК из НЧ может обеспечить пролонгированное действие ЛК и длительное поддержание ее терапевтической концентрации в крови.

На следующем этапе работы оценивали влияние наноконструкций ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) в плазме крови, выделенной из крови здоровых доноров. Агрегацию Тц индуцировали арахидоновой кислотой (АК), поскольку в результате ее действия образуются различные метаболиты, в том числе продукты ПОЛ. Было показано, что Лс ЛК (1–2 мМ) снижают степень и скорость агрегации Тц на 30–45 % относительно контроля. Все типы НЭ ЛК (1–4 мМ) существеннее (на 45–85 %) уменьшают агрегацию Тц, обусловленную АК. Водорастворимые формы и НЧ без ЛК практически не оказывали влияния на агрегацию Тц. По-видимому, нанодисперсии с ЛК способны лучше проникать внутрь клеток за счет взаимодействия липидов с мембраной клеток или в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Антиоксидантное действие НЧ с ЛК оценивали по концентрации активных форм кислорода (АФК) и продуктов ПОЛ в образцах обогащенной Тц плазмы, инкубированных с АК. Добавление НЧ с ЛК к образцам плазмы крови приводило к значительному уменьшению количества АФК (в 2–5 раз) и продуктов ПОЛ (5–20 раз). Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали все типы НЭ с ЛК при использовании максимально исследуемой концентрации ЛК. Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия НД с ЛК можно считать ингибирование ею процесса инициирования продуктов пероксидации липидов и АФК с помощью АК.

Таким образом, наночастицы с ЛК являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vivo*.

Литература

1. Inshakova A. M., Shchelkonogov V. A. et. al. Antioxidant and antiplatelet effect of nanodispersions with conjugate of glutathione and lipoic acid // Mend. Commun. 2024. Vol. 34. P. 887–889.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-155

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТА ПРОТИВОГОЛОЛЕДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ *DANIO RERIO*

THE IMPACT OF A COMPONENT OF DE-ICING MATERIALS ON THE BEHAVIORAL ACTIVITY *OF DANIO RERIO*

Е. И. Яголович[1], И. Х. Джуманиязова[1,2]

[1] *Специализированный учебно-научный центр МГУ*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E. I. Yagolovich[1], I. K. Dzhumaniyazova[1,2]

[1] *Advanced Educational Scientific Center MSU*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ kateyagolovich@yandex.ru

Аннотация

В работе исследовано влияние компонента противогололедных материалов (2%-й хлористый кальций-натрий жидкий, ХКНж) на параметры поведенческой активности *Danio rerio* в тесте «открытое поле». Выявлено, что ХКНж оказывает гиподинамическое влияние на поведение рыб, что может быть связано с изменением осмотического давления для них. Таким образом, *Danio rerio* может служить удобной моделью для оценки антропогенных и техногенных воздействий.

Abstract

The effect of the component of deicing materials (2 % liquid calcium-sodium chloride, lCSC) on the parameters of the behavioral activity of *Danio rerio* in the “Open Field” test was investigated. It was revealed that lCSC has a hypodynamic effect on fish behavior, which may be associated with changes in osmotic pressure. Therefore, *Danio rerio* can serve as a convenient model for assessing anthropogenic and man-made impacts.

В настоящее время крайне популярно использование противогололедных материалов (ПГМ) в зимний сезон, которые могут быть опасны для животных, в особенности для пресноводных рыб. При таянии снега в водоемы стекает вода, а вместе с ней все потенциально токсичные вещества, которые входят в состав ПГМ. Вследствие этого возникает загрязнение водоемов. Его последствия многообразны: от изменения поведенческой активности рыб, обитающих в данных водоемах, до их массовой гибели. В работе использовали *Danio rerio* в качестве модельного объекта для исследования воздействий ПГМ на пресноводных рыб.

Для проведения экспериментов была выбрана наиболее распространенная форма ПГМ — солевая смесь NaCl (0,05 %) и $CaCl_2$ (0,15 %) (хлористый кальций-натрий жидкий, ХКНж), с сохранением соотношения компонентов, но в сниженной концентрации, поскольку при смыве солей в водоем происходит уменьшение концентрации с сохранением пропорциональных соотношений [1].



Рис. 1. Схема эксперимента

© Е. И. Яголович, И. Х. Джуманиязова, 2025

Для изучения поведенческой активности использовался тест «открытое поле». Рыб помещали в новую емкость с ровным дном и стенками, наблюдая за их поведением в течение 3 мин (рис. 1). Статистический анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism, статистические тесты указаны в подписях к рисункам, а уровень значимости приняли за 0,05.

Рыбы в стрессе мало двигаются и предпочитают находиться у дна [2, 3]. Таким образом, тест позволил оценить двигательную активность, исследовательское поведение и уровень тревожности.

Инкубация в 0,2%-м растворе ХКНж в течение 45 мин привела к статистически значимому снижению числа пройденных секторов теста «открытое поле» (рис. 2). Также наблюдалась тенденция к увеличению времени, проведенного у дна, и уменьшению времени, проведенного у поверхности, после инкубации в солевом растворе, что является показателем тревожного поведения у рыб.

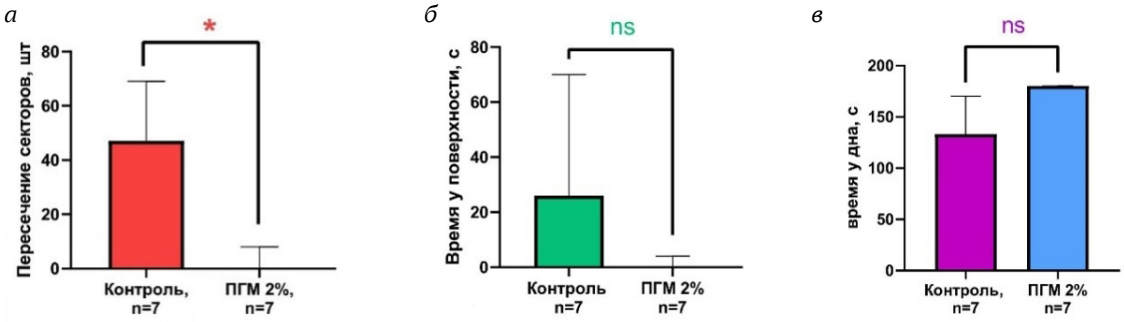


Рис. 2. Изменения в поведении рыб в тесте «открытое поле»: *а* — изменение количества пройденных секторов; *б* — изменение времени, проведенного у поверхности; *в* — изменение времени, проведенного у дна; * — $p < 0,05$, тест Вилкоксона для связанных выборок; *ns* — незначимые отличия по результатам теста Вилкоксона для связанных выборок

В результате экспериментов было выявлено, что инкубация в 0,2%-м растворе солей ХКНж оказывает гиподинамическое влияние на поведение пресноводных рыб, что может быть связано с изменением осмотического давления для них. Таким образом, активное использование ПГМ на основе хлоридов натрия и кальция может приводить к изменению поведения обитателей пресноводных водоемов. Также методика определения активности рыб с помощью модельного объекта *Danio rerio* может использоваться для оценки степени техногенного загрязнения водоемов, расположенных близ городов.

Литература

1. Методические рекомендации по применению чистых низкотемпературных противогололедных материалов для зимнего содержания автомобильных дорог. М.: Федеральное дорожное агентство (РОСАВТОДОР), 2019. С. 52.

2. Stewart A. M., Kalueff A. V. The open field test in zebrafish // Zebrafish. 2012. No. 9 (2). P. 126–132.

3. Maximino C., de Oliveira L., Herculano T. et al. Parameters of anxiety in zebrafish // Behavioural Brain Research. 2010. No. 214 (2). P. 430–437.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-156

ДОСТАВКА МРНК, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕН ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА A/H5NX, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ*

DELIVERY OF MRNA ENCODING HEMAGGLUTININ OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE A/H5NX USING LIPID NANOPARTICLES

В. А. Яковлев, В. Р. Литвинова, Е. В. Тигеева, Н. Б. Рудометова, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, К. П. Макарова, Д. И. Вахитов, Л. А. Кисакова, Л. И. Карпенко, А. П. Рудометов

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

V. A. Yakovlev, V. R. Litvinova, E. V. Tigeeva, N. B. Rudometova, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, K. P. Makarova, D. I. Vahitov, L. A. Kisakova, L. I. Karpenko, A. P. Rudometov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ yva20009@mail.ru

Аннотация

В данной работе были получены и охарактеризованы препараты mRNA-H5, инкапсулированной в липидные наночастицы. Было показано, что mRNA-H5-ЛНЧ эффективно стимулирует специфический гуморальный иммунный ответ и обеспечивает 100%-ю защиту иммунизированных мышей от летального заражения штаммами вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Abstract

In this work, formulations of mRNA-H5 encapsulated in lipid nanoparticles were obtained and characterized. It was shown that mRNA-H5-LNP effectively stimulate a specific humoral immune response and provide 100 % protection of immunized mice from lethal challenge with influenza virus strains A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) and A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

По данным Всемирной организации здравоохранения, на 13 июня 2025 г. было зарегистрировано 976 случаев заражения людей высокопатогенным вирусом гриппа птиц (HPAI) подтипа A/H5N1, из которых 470 привели к смерти. Дальнейшая передача вирусов HPAI H5Nx среди птиц и млекопитающих представляет угрозу появления нового вируса HPAI и вызывает опасения по поводу возможной пандемии.

Перспективной вакцинной платформой для защиты от вирусов гриппа являются мРНК-вакцины, обладающие рядом преимуществ, выгодно выделяющих их в сравнении с классическими инактивированными вакцинами. Известно, что мРНК в «голом» виде проявляет низкую иммуногенность, которую можно усилить на порядки с помощью подходящих методов доставки. Таким методом являются зарекомендовавшие себя липидные наночастицы (ЛНЧ). Они способны успешно доставлять мРНК в иммунокомпетентные клетки, а также защищать ее от деградации внеклеточными нуклеазами.

Ранее в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была получена кандидатная мРНК-вакцина, кодирующая модифицированный тример гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), названная mRNA-H5.

Целью данной работы стала оценка иммуногенных и протективных свойств mRNA-H5, вводимой в организм мышей с использованием ЛНЧ.

Для иммунизации mRNA-H5 была инкапсулирована в ЛНЧ, которые были охарактеризованы и проанализированы методами динамического и электрофоретического светорассеяния, а также методом электронной микроскопии. Показано (рис. 1), что используемый состав ЛНЧ обеспечивает инкапсуляцию более 90 % мРНК, формируя монодисперсную суспензию наночастиц со средним размером 93,5 ± 0,8 нм. ζ-потенциал наночастиц составил −0,02 ± 0,26, что указывает на практически полную инкапсуляцию мРНК в наночастицы. В качестве контроля были также получены ЛНЧ без мРНК, со средним размером 131,6 ± 1,6 нм и ζ-потенциалом 1,15 ± 0,26.

Была проведена иммунизация мышей BALB/c полученным препаратом mRNA-H5-ЛНЧ в дозе 10 мкг мРНК, рекомбинантным белком HA/H5 в дозе 25 мкг, а также препаратом ЛНЧ без мРНК, содержащим экви-

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

© В. А. Яковлев, В. Р. Литвинова, Е. В. Тигеева, Н. Б. Рудометова, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, К. П. Макарова, Д. И. Вахитов, Л. А. Кисакова, Л. И. Карпенко, А. П. Рудометов, 2025

валентную опытной группе дозу ЛНЧ в качестве контроля. Дополнительным контролем выступала группа интактных мышей. На 35-е сутки после 2-й иммунизации оценили гуморальный иммунный ответ методом ИФА. Показано (рис. 2, *1*), что иммунизация мышей линии BALB/c полученной мРНК-вакциной вызывает выработку высокого титра специфических антител (средний титр специфических антител 1 : 656000). Данный титр статистически значимо отличался от остальных групп, включая группу, иммунизированную рекомбинантным белком с гидроокисью алюминия (средний титр в данной группе составил 1 : 175000).

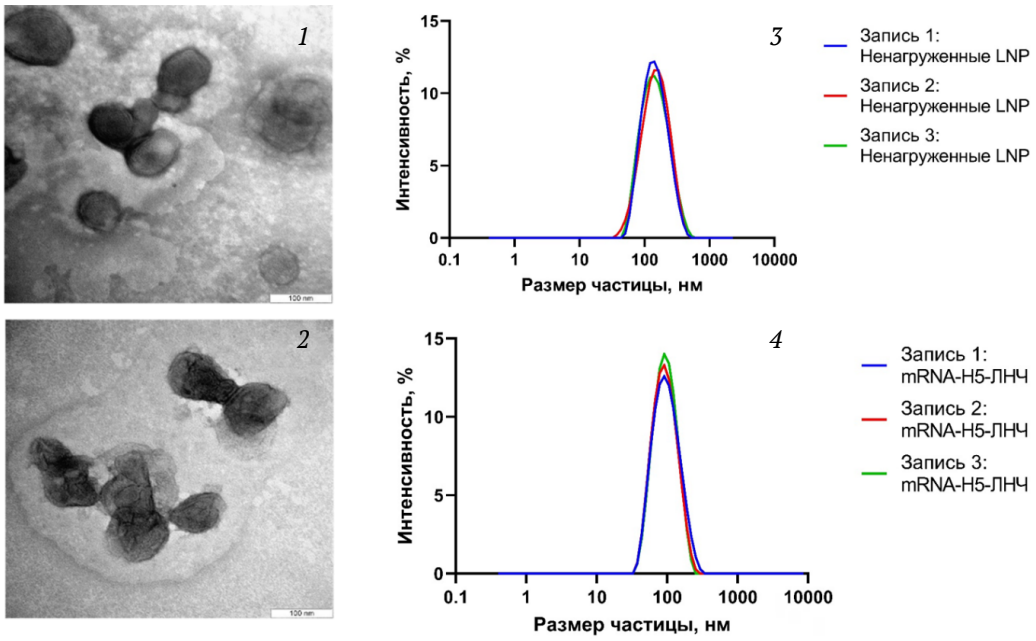


Рис. 1. Электронная микрофотография комплексов mRNA-H5-ЛНЧ (*1*), ЛНЧ без мРНК (*2*). Динамическое рассеяние света: профили распределения размеров ЛНЧ без мРНК (*3*) или с мРНК (*4*)

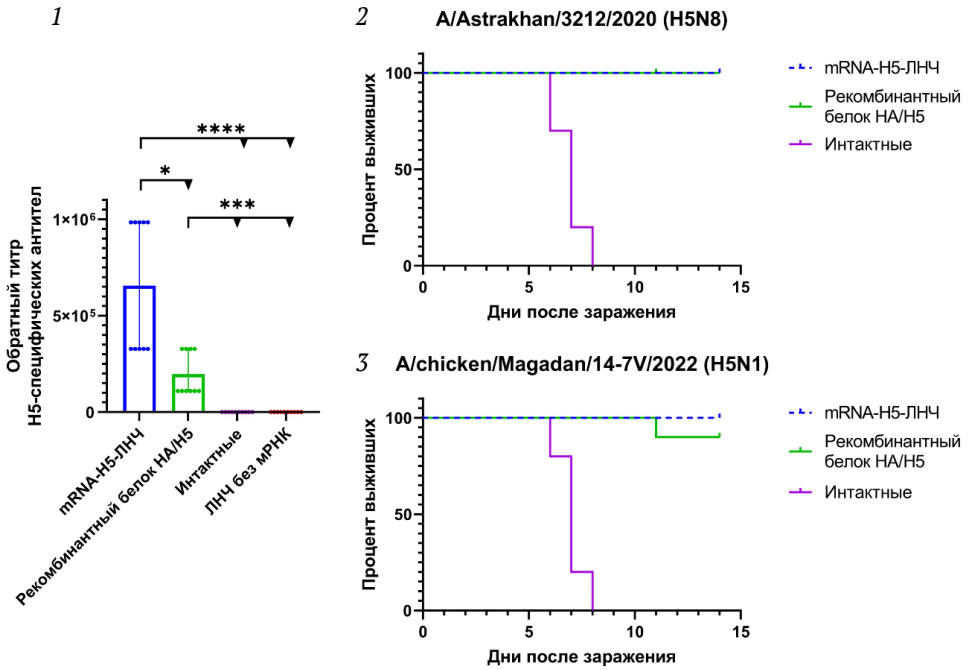


Рис. 2. Иммуногенные и защитные свойства mRNA-H5: *1* — реципрокный титр (разведение) антител, специфичных к H5, выявленных в иммунных сыворотках с помощью ИФА (* $p < 0{,}05$; *** $p < 0{,}001$; **** $p < 0{,}0001$); *2, 3* — кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения штаммом вируса гриппа: A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) соответственно

Далее мышей, иммунизированных mRNA-H5-ЛНЧ, рекомбинантным белком HA/H5, а также интактных мышей разделили на 2 подгруппы и заражали интраназально штаммами вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1). В результате было показано (рис. 2, *2, 3*), что выживаемость в группах мышей, иммунизированных mRNA-H5 с использованием ЛНЧ, при заражении обоими штаммами составляет 100 %. В группе, иммунизированной рекомбинантным белком, выживаемость при заражении гомологичным штаммом составила 100 %, а при заражении гетерологичным штаммом — 90 %.

Протективные свойства вакцины в отношении нескольких штаммов вируса гриппа могут указывать на универсальность данной вакцины, что требует дальнейшего исследования протективности в отношении большего числа гетерологичных штаммов. Проведенное исследование указывает на то, что mRNA-H5, инкапсулированная в ЛНЧ, является перспективным кандидатом в качестве вакцины против гриппа, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа A/H5 с пандемическим потенциалом.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-157

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ТЕРМИНАТОРА НА СТАБИЛЬНОСТЬ МРНК И ПРОДУКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *E. COLI*

EFFECT OF TERMINATOR MODIFICATION ON MRNA STABILITY AND PRODUCTIVITY OF *E. COLI* STRAINS

М. С. Яровикова[1], Е. А. Буслаева[1],
М. Д. Бочкарева[1], З. Р. Хасаншина[1,2]

[1] *R&D ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург*
[2] *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

M. S. Yarovikova[1], E. A. Buslaeva[1],
M. D. Bochkareva[1], Z. R. Khasanshina[1,2]

[1] *R&D GEROPHARM, Saint Petersburg*
[2] *ITMO University, Saint Petersburg*

✉ Marina.Iarovikova@geropharm.com

Аннотация

В настоящем исследовании рассмотрено влияние модификации терминаторных последовательностей на стабильность мРНК и продуктивность штаммов *Escherichia coli* (*E. coli*), продуцирующих рекомбинантные белки. Показано, что стабильность мРНК частично коррелирует с удельной продуктивностью, однако данная взаимосвязь существенно варьирует в зависимости от плазмидной конструкции.

Abstract

This study evaluated the impact of terminator sequence modification on mRNA stability and productivity in recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. The results revealed a partial correlation between mRNA half-life and specific protein yield, with outcomes varying in accordance with plasmid context.

Введение

С увеличением потребности в рекомбинантных терапевтических белках возрастает необходимость повышения эффективности их биосинтеза. Одним из ключевых факторов, влияющих на уровень экспрессии, является стабильность мРНК. *E. coli* остается одной из наиболее востребованных систем экспрессии рекомбинантных белков, однако нестабильность мРНК в бактериальных клетках часто ограничивает выход целевого продукта, и до сих пор не существует универсальной методики оценки стабильности этой молекулы. Одним из ключевых факторов, влияющих на стабильность мРНК, являются вторичные структуры, такие как 5′- и 3′-шпильки, которые защищают транскрипты от деградации рибонуклеазами. В частности, модификации терминаторных последовательностей могут значительно увеличить период полураспада мРНК и, как следствие, уровень экспрессии белка. Несмотря на это, взаимосвязь между стабильностью мРНК и конечной продуктивностью штамма остается не до конца изученной [1–3].

Цель работы заключалась в исследовании влияния модификации терминаторных последовательностей на стабильность мРНК и продуктивность штаммов *E. coli*, а также в разработке аналитического инструмента для измерения периода полураспада бактериальной мРНК.

Материалы и методы

В исследовании были использованы две группы трансформированных штаммов *E. coli* BL21, экспрессирующих различные рекомбинантные белки. В каждой группе один штамм содержал модифицированный терминатор, второй — исходную (контрольную) конструкцию. После ферментации и выделения клеточной биомассы проводилась оценка удельной продуктивности методом капиллярного электрофореза.

Стабильность мРНК оценивали с помощью количественной обратной транскриптазной ПЦР (RT-qPCR). Расчет периода полураспада осуществлялся на основании модели однофазного экспоненциального распада, обработка данных производилась в среде GraphPad Prism.

© М. С. Яровикова, Е. А. Буслаева, М. Д. Бочкарева, З. Р. Хасаншина, 2025

Результаты

В группе 1 (штаммы BL21/pF644 и BL21/pF1378) модификация терминатора сопровождалась увеличением удельной продуктивности на 10 % (рис. 1), при этом период полураспада мРНК изменился незначительно на +2,2 % (рис. 2).

В группе 2 (штаммы BL21/pF1317 и BL21/pF1319) аналогичная модификация привела к существенному повышению продуктивности на 80 % (см. рис. 1), тогда как стабильность мРНК уменьшилась на 28 % (рис. 3).

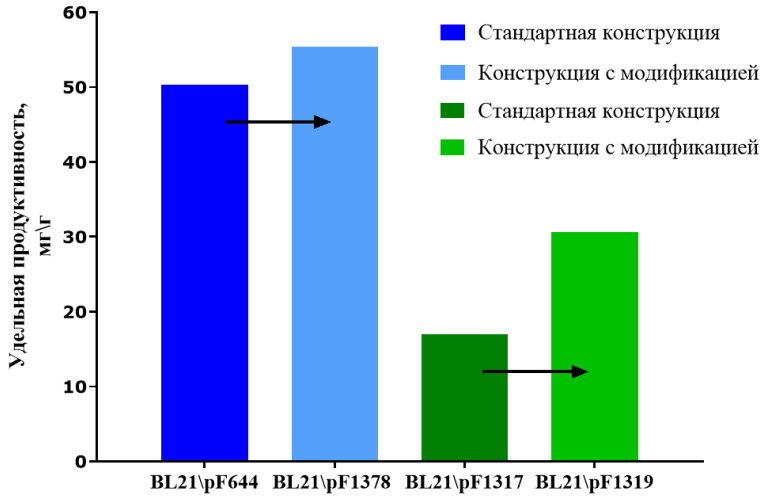


Рис. 1. Сравнение удельной продуктивности исследуемых штаммов

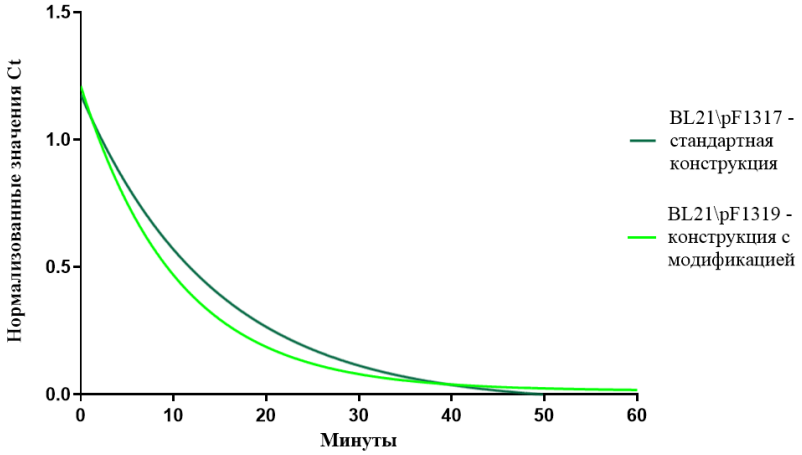


Рис. 2. Результаты оценки стабильности мРНК штаммов BL21/pF644, BL21/pF1378

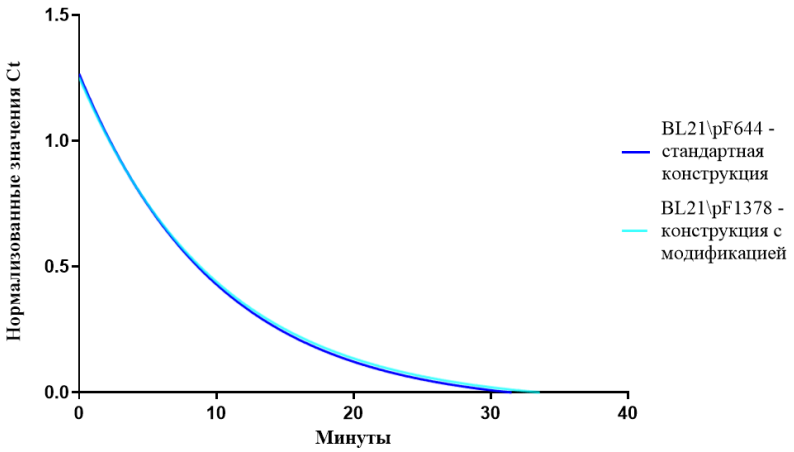


Рис. 3. Результаты оценки стабильности мРНК штаммов BL21/pF1317, BL21/pF1319

По результатам, полученным по обеим группам, можно заключить, что наличие дополнительной вторичной структуры в области терминатора способствует увеличению продукции целевого белка. Однако повышение продуктивности не всегда коррелирует с ростом стабильности мРНК.

Таким образом, в обеих исследуемых группах значимых изменений в стабильности мРНК не было зафиксировано. Введение дополнительной вторичной структуры в терминаторной области приводило к увеличению выхода целевого белка, однако в данном случае с увеличением стабильности мРНК это не коррелировало.

Выводы

1. Влияние модификаций терминаторных последовательностей на стабильность мРНК и продуктивность штаммов сильно зависит от особенностей экспрессируемого белка.

2. Повышение продуктивности рекомбинантного белка не всегда сопровождается увеличением периода полураспада мРНК.

3. Для конструирования эффективных систем экспрессии необходим индивидуальный подход к дизайну нуклеотидных последовательностей терминаторов с учетом биологического контекста.

Литература

1. Carrier T. A., Keasling J. D. Controlling Messenger RNA Stability in Bacteria: Strategies for Engineering Gene Expression // Biotechnol. Prog. 1997. Vol. 13, No. 6. P. 699–708.

2. Vargas-Blanco D. A., Shell S. S. Regulation of mRNA Stability During Bacterial Stress Responses // Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. P. 2111.

3. Chen L. H. et al. Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5′ untranslated region of ompA mRNA // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173, No. 15. P. 4578–4586.

РАЗДЕЛ III

БИОФИЗИКА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-158

FUNCTIONAL PROPERTIES OF SPIN TRAPPING AGENTS FOR ENHANCED DETECTION OF SINGLET OXYGEN IN PHOTODYNAMIC THERAPY APPLICATIONS

S.A. Dementev[1,2], R.A. Podarov[1,2], N.E. Sannikova[1,2], Y.F. Polienko[3], I.A. Kirilyuk[3], O.A. Krumkacheva[1,2]

[1] *International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*
[3] *Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉ dementev.epr@gmail.com

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) utilizes photosensitizers (PSs) generating singlet oxygen ($^1O_2$) upon light activation to eliminate cancer cells. Accurate PS $^1O_2$ generation capacity assessment is essential for novel PSs. This study presents novel $^1O_2$ spin traps with enhanced efficiency at physiological pH, where the others are ineffective, enabling measurements in biologically relevant environments.

PDT is a clinically promising cancer treatment that relies on PS reacting with triplet oxygen and generating reactive oxygen species (ROS) upon light activation, leading to targeted cell death [1, 2]. Among ROS, $^1O_2$ is recognized as the primary cytotoxic agent responsible for therapeutic efficacy in tumors with a regular oxygen supply. The advancement of PDT technology critically depends on identifying and characterizing new PSs with high ROS generation efficiency.

Accurate evaluation of $^1O_2$ production is essential for the development and optimization of PSs. The spin trapping (ST) technique combined with electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is a powerful approach for detecting ROS. In this method, a diamagnetic ST reacts with ROS to form a stable paramagnetic radical detectable by EPR, enabling quantitative and selective measurement of ROS. However, most contemporary $^1O_2$ STs often exhibit an undesired pH increase, which can induce side reactions [3], including radical degradation and aggregation of PS molecules like cationic porphyrins. Additionally, the strong alkalinity of these compounds obstructs $^1O_2$ capturing at physiological conditions. These issues hinder the reliable assessment of PS performance in biologically relevant environments.

This study presents the evaluation of both established and novel STs. The novel STs feature a trimethylammonium substituent at the 4-position of the piperidine ring, designed for enhanced solubility and efficiency at physiological pH. Their pKa values were measured via NMR. Then, using the model PS meso-5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridyl-4′) porphyrin, the steady-state photolysis experiments at different pH levels were conducted to determine their efficiency. Control experiments with sodium azide confirmed the high selectivity of these STs for $^1O_2$. The improved functional properties of these STs enable more precise and reliable ROS measurement, facilitating the screening and development of effective PS for PDT.

Our findings contribute to the technological advancement of PDT by providing robust tools for singlet detection under physiological conditions, supporting the engineering of next-generation PSs with optimized therapeutic performance.

References

1. Falk-Mahapatra R., Gollnick S.O. Photodynamic therapy and immunity: an update // J. Photochem. Photobiol. 2020. Vol. 96, No. 3. P. 550–559.

2. Kaeser P.S., Regehr W.G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release // Annu. Rev. Physiol. 2014. Vol. 76. P. 333–363.

3. Victória H.F.V. et al. Detection of singlet oxygen by EPR: The instability of the nitroxyl radicals // Free Radic. Biol. Med. 2022. Vol. 180. P. 143–152.

© S.A. Dementev, R.A. Podarov, N.E. Sannikova, Y.F. Polienko, I.A. Kirilyuk, O.A. Krumkacheva, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-159

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR NONINVASIVE CARDIAC PACING BASED ON THERMOSENSITIVE CHANNELS *

V. D. Dzhabrailov[1], E. A. Turchaninova[1], M. M. Slotvitskiy[1,2], V. S. Ovechkina[3,4], R. M. Karpov[3], A. A. Mozhaev[3,4], K. I. Agladze[1,2], V. A. Tsvelaya[1,2,5]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny*
[2]*Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*
[3]*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[4]*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow*
[5]*ITMO University, Saint Petersburg*

✉ dzhabrailov.vd@phystech.edu

Abstract

We have delivered the human TRPV1 thermosensitive cation channel gene into the culture of mouse neonatal cardiomyocytes and into the heart of an adult mouse. This made it possible to control the activity of the samples studied using short thermal pulses. We have successfully demonstrated the stimulation of both isolated cells in vitro and a whole heart in vivo, confirming the effectiveness of the approach.

Cardiac arrhythmias represent a major global health burden, with bradyarrhythmias being particularly life-threatening [1]. While implantable pacemakers and cardioverter-defibrillators remain the gold standard for treatment, these devices are associated with significant complications, including surgical risks, infections, lead dislodgement, and the need for periodic battery replacements. Recent studies report major complications in 8.2 % of patients within 90 days post-implantation [2], highlighting the urgent need for alternative therapeutic approaches. Emerging gene- and cell-based therapies offer promising solutions, with thermogenetics representing a particularly innovative strategy for cardiac rhythm modulation [3, 4].

In this study, we developed a thermogenetic pacing system utilizing the human transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel, a heat-sensitive cation channel naturally present in mammalian tissues. Using adeno-associated virus (AAV) vectors carrying cardiac-specific promoters, we achieved the targeted expression of TRPV1 in both isolated cardiomyocytes and intact mouse hearts. Our results demonstrate that short pulses of infrared (IR) laser illumination can reliably induce action potentials in TRPV1-expressing cardiomyocytes in vitro, with activation kinetics closely matching natural pacemaker activity.

To evaluate the efficacy of thermopacing, experiments were conducted using optical mapping with calcium- and voltage-sensitive dyes. The performed experiments (in vitro –cultured neonatal mouse cardiomyocytes; in vivo — perfused mouse heart/thin mouse heart slices) demonstrated that the developed thermopacing method provides sufficient spatial (1.8–2.2 mm) and temporal (4 Hz) resolution. Optical mapping experiments confirmed that thermogenetic pacing preserves normal wave propagation patterns to electrical pacing. Additionally, issues such as calcium overload in cells during prolonged thermopacing were investigated.

Based on the obtained results, it was concluded that tissue parameters (conduction velocity) and electrophysiological parameters (action potential duration) under thermopacing do not differ from those observed with standard cardiac tissue stimulation. This confirms that thermogenetics represents a viable alternative to traditional cardiac pacing technologies, offering advantages such as specificity, minimally invasive application, and reduced risk of long-term complications. Further development of this technology may lead to novel therapeutic strategies for cardiac rhythm control, particularly in high-risk patients prone to complications associated with conventional devices.

References

1. Timmis A. et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2019 // Eur. Heart J. 2020. Vol. 41, No. 1. P. 12–85.

2. Ranasinghe I. et al. Institutional variation in quality of cardiovascular implantable electronic device implantation: a cohort study // Ann. Internal Med. 2019. Vol. 171, No. 5. P. 309–317.

3. Kaeser P. S., Regehr W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release // Ann. Rev. Physiol. 2014. Vol. 76, No. 1. P. 333–363.

4. Ermakova Y. G. et al. Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution // Nat. Commun. 2017. Vol. 8, No. 1. P. 15362.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #21-75-20143).

© V. D. Dzhabrailov, E. A. Turchaninova, M. M. Slotvitskiy, V. S. Ovechkina, R. M. Karpov, A. A. Mozhaev, K. I. Agladze, V. A. Tsvelaya, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-160

ANALYSIS OF EXTRACELLULAR VESICLES AT THE SINGLE LEVEL USING FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY ASSISTED BY MICROFLUIDICS *

D. D. Kozhevnikova[1], A. M. Yashchenok[1], A. V. Petukhov[2], A. V. Barulin[2], S. M. Novikov[2]

[1] *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny*

✉ daria.d.kozhevnikova@gmail.com

Abstract

We demonstrate a sensitive methodology for single-vesicle analysis of extracellular vesicles (EVs) using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) combined with microfluidic platforms. This integrated approach enhances detection resolution, enabling quantitative characterization of EV size, concentration, and dynamics in complex biological samples.

Extracellular vesicles (EVs) are nanoscale lipid bilayer-enclosed particles secreted by virtually all cell types. They play key roles in intercellular communication, immune modulation, and tumor progression, and serve as promising biomarkers in liquid biopsies [1]. Due to their small size (30–200 nm) and heterogeneous nature, accurate characterization of EVs at the single-particle level remains a significant analytical challenge [2]. To address these challenges, we developed an integrated approach combining fluorescence correlation spectroscopy (FCS) with microfluidic control for high-sensitivity single-EV analysis. EVs were fluorescently labeled using a lipophilic dye that incorporates into the vesicle membrane, enabling reliable signal detection. Labeling efficiency and specificity were confirmed using nanoparticle tracking analysis and confocal imaging.

FCS enables high-resolution analysis of fluorescently labeled particles diffusing through a confocal volume, yielding information on particle size, concentration, and diffusion dynamics. However, conventional FCS is limited by low throughput and poor control over particle flow [3]. To overcome these drawbacks, we incorporated a precisely engineered microfluidic system that ensures stable sample flow, reduced background, and improved reproducibility. Hydrodynamic focusing was used to guide EVs through the detection region in a narrow stream, allowing consistent excitation conditions. To interpret the data under flow, we used a laminar flow-adapted diffusion model that accounts for both lateral diffusion and axial convection. This model was validated using monodisperse fluorescent beads with known physical properties.

In addition to autocorrelation analysis, we applied burst analysis to the same fluorescence time traces. This method detects and characterizes individual fluorescence bursts as single EVs transit the detection volume. Burst parameters such as intensity, duration, and count rate provide valuable information about vesicle brightness, concentration, and heterogeneity. This approach complements FCS by enabling discrete, event-based analysis and improving detection of rare or highly fluorescent particles [4]. In the EV samples derived from human plasma and conditioned cell culture media the described methods revealed in the distinct EV subpopulations with different diffusion behaviors and brightness profiles, suggesting heterogeneity in size, composition, or labeling efficiency.

Overall, the integration of FCS with microfluidics and burst analysis provides a robust and sensitive platform for high-resolution, single-vesicle characterization. This system allows for precise measurement of EV size, concentration, and heterogeneity while capturing dynamic behaviors under flow. Building on this foundation, we are now extending the method to investigate specific molecular features of individual EVs. As a first step, we aim to fluorescently label and detect key surface proteins such as CD63, CD9, and HER2, which are relevant for vesicle classification and disease-specific profiling. This direction moves us toward molecular-level characterization of exosomes in complex biological samples, with the long-term goal of enabling targeted biomarker discovery, refined diagnostics, and improved EV-based therapeutic development.

References

1. Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes // Sci. 2020. Vol. 367 (6478): eaau6977.

2. Chiang Cy., Chen C. Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level // J. Biomed. Sci. 2019. Vol. 26 (1). P. 9.

3. Tian Y., Martinez M. M., Pappas D. Fluorescence correlation spectroscopy: a review of biochemical and microfluidic applications // Appl. Spectrosc. 2011. Vol. 65 (4). P. 115A–124A.

4. Sanaee M. et al. Coincident Fluorescence-Burst Analysis of the Loading Yields of Exosome-Mimetic Nanovesicles with Fluorescently-Labeled Cargo Molecules // Small. 2022. Vol. 18 (12): e2106241.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #23-74-00022).

© D. D. Kozhevnikova, A. M. Yashchenok, A. V. Petukhov, A. V. Barulin, S. M. Novikov, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-161

IONIZING RADIATION INDUCES MONO- AND MULTINUCLEATED GIANT CANCER CELLS IN A DOSE-DEPENDENT MANNER IN HELA CELLS *

C. E. Oguji[1], I. R. Seriev[1], D. V. Skamnitskiy[2], N. Yu. Shilyagina[1]

[1] *Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod*
[2] *Nizhny Novgorod Regional Oncology Hospital*

✉ cyprian.emeks@gmail.com

Abstract

We investigated the effect of ionizing radiation on HeLa cancer cell. Our results show that ionizing radiation induces dose-dependent formation of polyploid giant tumour cells, with higher doses (8 and 12 Gy) leading to a greater number of these cells, while lower doses were insufficient for their formation.

Radiotherapy relies on ionizing radiation to induce DNA damage in cancer cells, ultimately leading to cell death. However, this death is not always immediate and may result in the survival of cancer cell subpopulations with altered properties. One such outcome is the formation of Mono- and Multinucleated Giant Cancer Cells (MGCCs)/Polyploid giant cancer cells (PGCCs), genetically unstable cells that can arise from failed cytokinesis, cellular fusion or aberrant cell division processes. These cells are increasingly recognized for their role in therapy resistance, dormancy, tumour repopulation, and metastasis.

Our study aims to characterize the formation of MGCCs following ionizing radiation in cancer cell lines, starting with HeLa cells. The experiments were conducted using the Novalis TX electron accelerator, delivering radiation at a dose rate of 600 Gy/hour. The lethal dose 50 (LD50) for HeLa cells was determined to be 6 Gy and used to guide experimental dose selection.

HeLa cells were irradiated with 4 Gy, 8 Gy, and 12 Gy, and giant cell formation was monitored over a 5-day period. By day 3, 8 Gy irradiation induced a prominent population of MGCCs, including both mononuclear and multinucleated forms, making it an optimal dose for yielding these therapy-resistant cells. By day 5, a noticeable increase in giant cell percentage was observed in the 4 Gy group, whereas the 8 Gy group showed a decline, suggesting the beginning of cytotoxic effects overtaking MGCC proliferation. At 12 Gy, while multinucleated giant cells were also observed, there was a marked reduction in overall cell viability. Abnormal nuclear morphologies, such as nuclear distortion and fragmentation, were prominently seen in cells irradiated with 8 Gy and 12 Gy by day 5.

Lower doses (4 Gy) tend to induce mainly mononuclear giant cells with higher survival rates, while intermediate (8 Gy) and higher doses (12 Gy) more effectively induce MGCCs, particularly multinucleated types. However, excessive radiation (12 Gy) severely compromises cell viability, limiting its utility for extended studies.

Ionizing radiation induces giant cancer cell formation in a dose-dependent manner in HeLa cells. While 4 Gy favours mononuclear giant cells, doses of 8 Gy and 12 Gy effectively induce both mono- and multinucleated giant cells. Among these, 8 Gy offers an optimal balance between MGCC induction and cell viability, making it suitable for further mechanistic studies. Understanding MGCC behaviour may provide valuable insights into radiation resistance and cancer recurrence.

Conclusively, our study demonstrates that ionizing radiation induces the formation of mono- and multinucleated giant cancer cells in HeLa cells in a dose-dependent manner. While lower doses promote primarily mononuclear forms, higher doses, particularly 8 Gy, effectively induce therapy-resistant MGCCs without severely compromising viability. These findings underscore the importance of MGCCs in radiation response and highlight their potential role in cancer recurrence and resistance.

* The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State assignment FSWR-2023-0032).

© C. E. Oguji, I. R. Seriev, D. V. Skamnitskiy, N. Yu. Shilyagina, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-162

ПЕПТИД СЛИЯНИЯ FP1 S-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 ФОРМИРУЕТ И ИНГИБИРУЕТ ПОРЫ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ АНАЛОГИЧНО АНТИМИКРОБНЫМ ПЕПТИДАМ *

THE FP1 FUSION PEPTIDE OF THE SARS-COV-2 CORONAVIRUS S PROTEIN FORMS AND INHIBITS PORES IN LIPID MEMBRANES SIMILAR TO THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES

З. Г. Дениева, О. В. Батищев

Институт физический химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва

Z. G. Denieva, O. V. Batishchev

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow

✉ zaret03@mail.ru

Аннотация

Мы изучили способность пептида слияния FP1 S-белка коронавируса SARS-CoV-2 формировать поры в мембранах в зависимости от липидного окружения. Механизмы такой активности аналогичны действию антимикробных пептидов. В результате пептид-липидного взаимодействия происходит перераспределение пептидов на обоих монослоях мембраны, которое приводит к ингибированию последующего формирования пор.

Abstract

We studied the ability of the FP1 fusion peptide of SARS-CoV-2 coronavirus S protein to form pores in membranes depending on the lipid environment. The mechanisms of this activity are similar to the action of antimicrobial peptides. As a result of the peptide-lipid interactions, a redistribution of peptides occurs on both membrane monolayers, which leads to inhibition of subsequent pore formation.

Коронавирус SARS-CoV-2, возбудитель пандемии COVID-19, относится к классу оболочечных вирусов с положительной цепью РНК. Геном таких вирусов спрятан в белковом капсиде, окруженном липидной мембраной. Геном SARS-CoV-2 кодирует четыре основных структурных белка: поверхностный (S), мембранный (M), оболочечный (E) и нуклеокапсидный (N) [1]. Белок S опосредует связывание вируса с рецепторами на поверхности клетки-хозяина, что приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран и проникновению вируса в клетку. Этот белок состоит из двух функциональных субъединиц: рецептор-связывающей S1 и опосредующей слияние S2, которая содержит пептид слияния FP. В результате конформационных перестроек в S2 происходит выход пептида слияния с его последующим проникновением в мембрану клетки и инициацией вирусного слияния.

Пептид слияния S-белка коронавируса SARS-CoV-2 включает два участка, FP1 и FP2, расположенные на N- и C-конце соответственно. Эта последовательность содержит высококонсервативные среди коронавирусов участки [2, 3], что делает ее перспективной мишенью для разработки новых противовирусных средств. Было показано, что участок FP1 пептида слияния способствует образованию пор и изменяет механические свойства мембраны, причем эффект модулируются составом мембраны и механическим напряжением [4]. Такая способность пептидов формировать поры в липидных мембранах свойственна также амфипатическим антимикробным пептидам. Ранее нами были установлены физико-химические механизмы действия антимикробных пептидов [5, 6], которые предполагают перераспределение пептидов между монослоями мембраны, после чего сами же пептиды ингибируют дальнейшее образование пор.

В настоящей работе с помощью метода конфокальной флуоресцентной микроскопии мы изучили способность участка FP1 пептида слияния S-белка коронавируса SARS-CoV-2 формировать и ингибировать поры в липидных мембранах. На системе гигантских однослойных везикул мы показали, что адсорбция FP1 в микромолярных концентрациях приводит к формированию пор в мембранах различного состава, тогда как предварительная обработка мембраны пептидом в наномолярной концентрации приводит к последующему ингибированию формирования пор. Такой эффект блокировки наблюдается и даже усиливается при замене пептида слияния FP1 на антимикробный пептид магаинин-1. Важным является то, что обнаруженное нами свойство подразумевает универсальность физико-химических механизмов пептид-липидных взаимодействий для вирус-

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

© З. Г. Дениева, О. В. Батищев, 2025

ных и антимикробных пептидов и может стать основой для разработки новых подходов к созданию противовирусных препаратов.

Литература

1. Masters P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses // Adv. Virus Res. 2006. Vol. 66. P. 193–292.

2. Tang T., Bidon M., Jaimes J. A. et al. Coronavirus Membrane Fusion Mechanism Offers a Potential Target for Antiviral Development // Antiviral Res. 2020. Vol. 178. P. 104792.

3. Madu I. G., Roth S. L., Belouzard S., Whittaker G. R. Characterization of a Highly Conserved Domain within the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein S2 Domain with Characteristics of a Viral Fusion Peptide // J. Virology. 2009. Vol. 83. P. 7411–7421.

4. Sumarokova M., Pavlov R., Lavushchenko T. et all. SARS-CoV-2 FP1 Destabilizes Lipid Membranes and Facilitates Pore Formation // Int. J. Mol. Sci. 2025. Vol. 26. P. 686.

5. Volovik M. V., Denieva Z. G., Kondrashov O. V. et al. Dialectics of antimicrobial peptides I: common mechanisms of offensive and protecting roles of the peptides. Preprint. DOI: 10.48550/arXiv.2502.09408.

6. Kondrashov O. V., Volovik M. V., Denieva Z. G. et al. Dialectics of antimicrobial peptides II: Theoretical models of pore formation and membrane protection. Preprint. DOI: 10.48550/arXiv.2502.09424.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-163

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АКТИВАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС

INVESTIGATION OF PRO-INFLAMMATORY MACROPHAGE ACTIVATION AND DIFFERENTIATION BY LC-MS ANALYSIS

О. В. Друсалевич, А. М. Рыскина, И. С. Кокаева, С. И. Ковальчук, И. В. Шелухина

Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

O. V. Drusalevich, A. M. Riskina, I. S. Kokaeva, S. I. Kovalchuk, I. V. Shelukhina

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ yaselodru@yandex.ru

Аннотация

В работе проведено исследование протеомных изменений при дифференцировке моноцитов линии THP-1 в макрофаги под действием форбол-12-мирристат-13-ацетата (PMA) и их последующей активации липополисахаридом (LPS) с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС).

Abstract

This study investigated proteomic changes during PMA-induced differentiation of THP-1 monocytes into macrophages and their subsequent LPS activation using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Through comprehensive proteomic profiling, we characterized molecular signatures associated with macrophage polarization, identifying key pathways involved in immune response regulation.

Макрофаги играют центральную роль в иммунном ответе, обеспечивая защиту организма от патогенов и участвуя в регуляции воспалительных процессов. В исследовании был проведен комплексный протеомный анализ клеток линии THP-1 с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС), который позволил идентифицировать и количественно оценить 4534 белка в трех экспериментальных группах: недифференцированные клетки (Control); клетки, дифференцированные под действием форбол-12-мирристат-13-ацетата (PMA); макрофаги, активированные липополисахаридом (LPS). Для обработки полученных данных применялись современные биоинформатические инструменты: программы PEAKS Studio, MaxQuant и Perseus, а функциональная интерпретация результатов проводилась с использованием баз данных Gene Ontology и KEGG.

С помощью t-критерия Стьюдента был обнаружен 151 статистически значимый белок для групп сравнения PMA-Control и 225 статистически значимых LPS-Control. Анализ показал, что обработка PMA приводит к значительным изменениям в экспрессии белков, связанных с реорганизацией цитоскелета (актин, тубулин) и процессами клеточной адгезии, что подтверждается обогащением таких KEGG-путей, как «регуляция актинового цитоскелета», а также к активации пути Rap1 (VASP, VAV3, MAP2K3, ITGB1, RRAS, SRC, F2R, RAPGEF1, BCAR1), что объясняется способностью PMA активировать PKC-зависимые процессы, влияющие на клеточную морфологию, адгезию и миграцию [1].

В случае активации LPS наблюдались выраженные изменения в компонентах иммунного ответа, включая активацию NOD-like рецепторного сигнального пути (IFI16, OAS1, OAS2, RIPK2, OAS3, TXN, GBP2, ANTXR2, GBP1, IRGM, GBP4, IRF9), который играет центральную роль в формировании инфламмасомы и продукции провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-18) [2]. Также активация LPS приводит к усилению TNF-зависимых сигнальных каскадов (MAP2K3, TRAF1, JUNB, ICAM1), что соответствует классическому воспалительному ответу через TLR4/NF-κB [3]. Воздействие PMA (в меньшей степени) и LPS (в большей степени) приводит к активации TNF-сигнального пути (MAP2K3, MMP14, TRAF1, TNFRSF1B, JUNB, MMP9, ICAM1,TNFRSF1A), что свидетельствует о различной степени воспалительного ответа на разных стадиях дифференцировки. Интересным наблюдением стало неожиданное обогащение пути «инфекция вирусом папилломы человека», что может свидетельствовать о перекрестной активации противовирусных механизмов при бактериальном воспалении.

Полученные результаты демонстрируют принципиальные различия в клеточных ответах на PMA и LPS, что имеет важное значение для понимания роли макрофагов в иммунной защите и воспалительных процессах. Выяв-

© О. В. Друсалевич, А. М. Рыскина, И. С. Кокаева, С. И. Ковальчук, И. В. Шелухина, 2025

ленные закономерности открывают новые перспективы для разработки target-терапии хронических воспалительных заболеваний. В дальнейших исследованиях планируется расширить анализ за счет включения биологических повторностей и дополнительных методов валидации (например, вестерн-блоттинга) для уточнения функциональной роли идентифицированных белков-кандидатов. Проведенная работа вносит существенный вклад в фундаментальное понимание молекулярных механизмов дифференцировки и активации макрофагов и подтверждает высокую эффективность современных протеомных технологий для изучения сложных клеточных процессов.

Литература

1. Cai Y., Sukhova, G. K., Wong, H. K. et al. Rap1 induces cytokine production in pro-inflammatory macrophages through NFκB signaling and is highly expressed in human atherosclerotic lesions // Cell Cycle. 2015. Vol. 14 (22). P. 3580–3592. URL: https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1100771.

2. Chu J. Q., Shi G., Fan Y. M. et al. Production of IL-1β and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in Toxoplasma gondii-Infected THP-1 Macrophages // Korean J. Parasitol. 2016. Vol. 54 (6). P. 711–717.

3. Liu T., Zhang L., Joo D. et al. NF-κB signaling in inflammation // Sig. Transduct. Target. Ther. 2017. Vol. 2. P. 17023. URL: https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-164

ПОВРЕЖДЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛОЙ И СРЕДНЕЙ ДОЗАХ *

MITOCHONDRIAL GENOME DAMAGE IN MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER LOW- AND MEDIUM-DOSE X-RAY EXPOSURE

М. В. Душенко[1], С. А. Абдуллаев[1,2], А. Н. Осипов[1,2]

[1]Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва
[2]Государственный научный центр — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России, Москва

M. V. Dushenko[1], S. A. Abdullaev[1,2], A. N. Osipov[1,2]

[1]Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow
[2]State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, FMBA of Russia, Moscow

✉ margd@list.ru

Аннотация

Проведено исследование воздействия рентгеновского излучения на функционирование митохондрий в мезенхимальных стволовых клетках (МСК). Через 24 ч после облучения в дозе 2 Гр мы регистрировали повреждения в мтДНК и яДНК, а также инициацию репликативного синтеза мтДНК с вовлечением поврежденных молекул. Повышенный уровень гетероплазмии мтДНК после облучения в дозе 2 Гр сопровождался снижением экспрессии генов, регулирующих динамику митохондрий.

Abstract

A comparative study of the effects of X-rays on mitochondrial function in mesenchymal stem cells (MSCs) was conducted. After 24 hours irradiation at a dose of 2 Gy, damage to mtDNA and nDNA was recorded, as well as the initiation of replicative mtDNA synthesis involving damaged molecules. An increased level of mtDNA heteroplasmy after irradiation at a dose of 2 Gy was accompanied by a decrease in the expression of genes regulating mitochondrial dynamics.

Сейчас наиболее исследованным типом клеток, используемым в регенеративной медицине, являются мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Способность дифференцироваться в разные типы клеток, сильные иммуномодулирующие свойства, а также секреция противовоспалительных веществ делают МСК эффективным инструментом для лечения различных патологий, в том числе для устранения негативных последствий лучевой терапии. Так была показана эффективность МСК в лечении радиационно-индуцированных повреждений сердца [1], кишечника [2] и легких [3]. Тем не менее, несмотря на положительные стороны использования МСК, существует ряд малоизученных аспектов, требующих дополнительных исследований. Одними из наиболее важных являются возможные негативные эффекты воздействия ионизирующего излучения в малых дозах при проведении часто сопутствующих клеточной терапии диагностических радиологических процедур, в частности КТ.

Существуют работы, свидетельствующие об увеличении рисков возникновения злокачественных новообразований у детей и подростков после проведения КТ [4–6]. С другой стороны, есть данные, свидетельствующие о положительных эффектах КТ-диагностики: уменьшение смертности от рака у людей [7–9] и экспериментальных животных [10].

Накопленные за последние годы сведения указывают на то, что важнейшей мишенью радиационного поражения, наряду с ядром, являются митохондрии. Известно, что структурные и функциональные нарушения, индуцируемые радиацией в этих органеллах, оказывают влияние на пострадиационное развитие целого комплекса эффектов на уровне клеток и целого организма животных и человека [11, 12].

В настоящее время считается, что митохондриальная ДНК (мтДНК) — более уязвимая мишень клетки, чем ядерная ДНК (яДНК), для эндогенных и экзогенных повреждающих агентов [13–15].

Цель настоящей работы — исследовать повреждения и восстановление мтДНК наряду с яДНК, определить уровень мутантных копий мтДНК, а также экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании,

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-14-00078).
© М. В. Душенко, С. А. Абдуллаев, А. Н. Осипов, 2025

регуляции биогенеза и динамики митохондрий в культивируемых МСК человека через 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 80 мГр и 2 Гр. Доза 80 мГр соответствует максимальной дозе, используемой при проведении КТ [16].

Оценивали наличие повреждений яДНК и мтДНК в МСК через 24 ч после облучения в дозах 80 мГр и 2 Гр. Установлено, что через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр повреждений в яДНК и мтДНК не регистрировалось. Однако после облучения МСК в дозе 2 Гр уровень синтезируемых продуктов ПЦР-ПФ яДНК и мтДНК существенно снижался по сравнению с контролем (необлученные клетки), что указывало на наличие в них повреждений, способных блокировать ПЦР-ПФ.

Известно, что в митохондриях млекопитающих, в том числе человека, эффективно функционирует только эксцизионная репарация оснований ДНК [18]. Более того, двунитевые разрывы (ДР) мтДНК не репарируются [19], и мтДНК с возникновением ДР может подвергаться деградации [20]. Поэтому можно предположить, что если восстановление яДНК в пострадиационный период в клетках происходит за счет репарационных систем, то стабильность мтДНК, скорее всего, обеспечивается за счет биогенеза митохондрий с синтезом новых копий мтДНК. Через 24 ч после облучения клеток в дозе 2 Гр наблюдалось увеличение количества копий мтДНК примерно на 50 % относительно контроля. После облучения в дозе 80 мГр количество копий мтДНК значимо не изменялось.

Полученные результаты свидетельствуют, что через 24 ч после облучения клеток в дозе 2 Гр происходит повышение уровня мутантных копий мтДНК примерно на 15 % относительно контроля. Однако после облучения в дозе 80 мГр мутантных копий мтДНК не регистрировалось. Появление новых мутантных копий мтДНК может привести к митохондриальной дисфункции с повышением окислительного стресса [11].

Анализ экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, показал, что через 24 ч после облучения клеток в дозе 2 Гр регистрировалось значимое снижение экспрессии всех этих генов. Что касается генов, контролирующих слияние и деление митохондрий, то их активность снижалась. При облучении в дозе 80 мГр экспрессия всех исследуемых нами генов мтДНК значимо не изменялась.

Таким образом, однократное воздействие рентгеновского излучения в дозе 80 мГр по всем анализируемым параметрам не приводило к митохондриальным нарушениям в МСК. Однако через 24 ч после облучения в дозе 2 Гр регистрировались повреждения в мтДНК и яДНК. В то же время наблюдалась активация синтеза мтДНК с повышенным уровнем гетероплазмии. Значит, увеличение количества копий мтДНК является результатом активации ядерных генов, контролирующих биогенез митохондрий.

Литература

1. Ullah I., Subbarao R. B., Rho G. J. Human mesenchymal stem cells — current trends and future prospective // Biosci. Rep. 2015. Vol. 35, No. 2. P. e00191. DOI: 10.1042/BSR20150025.

2. Konno M., Hamazaki T. S., Fukuda S. et al. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Vol. 400, No. 4. P. 461–465. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.029.

3. Wang Y., Yu X., Chen E., Li L. Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases // Stem. Cell. Res. Ther. 2016. Vol. 7, No. 1. P. 71. DOI: 10.1186/s13287-016-0330-3.

4. Morikawa S., Mabuchi Y., Niibe K. et al. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. Vol. 379, No. 4. P. 1114–1119. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.031.

5. Gao S., Zhao Z., Wu R. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model // Radiat. Environ. Biophys. 2017. Vol. 56, No. 1. P. 63–77. DOI: 10.1007/s00411-016-0675-0.

6. Gong W., Guo M., Han Z. et al. Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury // Cell. Death Dis. 2016. Vol. 7, No. 9. P. e2387. DOI: 10.1038/cddis.2016.276.

7. Perez J. R., Ybarra N., Chagnon F. et al. Tracking of mesenchymal stem cells with fluorescence endomicroscopy imaging in radiotherapy-induced lung injury // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 40748. DOI: 10.1038/srep40748.

8. Han M. A., Kim J. H. Diagnostic x-ray exposure and thyroid cancer risk: systematic review and meta-analysis // Thyroid. 2018. Vol. 28, No. 2. P. 220–228. DOI: 10.1089/thy.2017.0159.

9. Huang W. Y., Muo C. H., Lin C. Y. et al. Paediatric head CT scan and subsequent risk of malignancy and benign brain tumour: a nation-wide population-based cohort study // Br. J. Cancer. 2014. Vol. 110, No. 9. P. 2354–2360. DOI: 10.1038/bjc.2014.103.

10. Krille L., Dreger S., Schindel R. et al. Risk of cancer incidence before the age of 15 years after exposure to ionising radiation from computed tomography: results from a German cohort study // Radiat. Environ. Biophys. 2015. Vol. 54, No. 1. P. 1–12. DOI: 10.1007/s00411-014-0580-3.

11. Mathews J. D., Forsythe A. V., Brady Z. et al. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians // BMJ. 2013. Vol. 346. P. f2360. DOI: 10.1136/bmj.f2360.

12. Nawa T. Low-dose CT screening for lung cancer reduced lung cancer mortality in Hitachi City // Int. J. Radiat. Biol. 2019. Vol. 95, No. 10. P. 1441–1446. DOI: 10.1080/09553002.2018.1511930.

13. Ostrowski M., Marjanski T., Rzyman W. Low-dose computed tomography screening reduces lung cancer mortality // Adv. Med. Sci. 2018. Vol. 63, No. 2. P. 230–236. DOI: 10.1016/j.advms.2017.12.002.

14. Rampinelli C., De Marco P., Origgi D. et al. Exposure to low dose computed tomography for lung cancer screening and risk of cancer: secondary analysis of trial data and risk-benefit analysis // BMJ. 2017. Vol. 8, No. 356. P. j347. DOI: 10.1136/bmj.j347.

15. Lemon J.A., Phan N., Boreham D.R. Multiple CT scans extend lifespan by delaying cancer progression in cancer-prone mice // Radiat Res. 2017. Vol. 188. P. 495–504. DOI: 10.1667/RR14575.1.

16. Lemon J.A., Phan N., Boreham D.R. Single CT scan prolongs survival by extending cancer latency in Trp53 heterozygous mice // Radiat. Res. 2017. Vol. 188. P. 505–511. DOI: 10.1667/RR14576.1.

17. Abdullaev S., Gubina N., Bulanova T., Gaziev A. Assessment of nuclear and mitochondrial DNA, expression of mitochondria-related genes in different brain regions in rats after whole-body X-ray irradiation // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. P. 1196. DOI: 10.3390/ijms21041196.

18. Abdullaev S., Bulanova T., Timoshenko G., GazievA. I. Increase of mtDNA number and its mutant copies in rat brain after exposure to 150 MeV protons // Mol. Biol. Rep. 2020. Vol. 47, No. 6. P. 4815–4820. DOI: 10.1007/s11033-020-05491-7.

19. Abdullaev S.A., Minkabirova G.M., Bezlepkin V.G., Gaziev A.I. Cell-free DNA in the urine of rats exposed to ionizing radiation // Radiat. Environ. Biophys. 2015. Vol. 54, No. 3. P. 297–304. DOI: 10.1007/s00411-015-0599-0.

20. Kam W. W-Y., Banati R.B. Effects of ionizing radiation on mitochondria // Free Radic Biol. Med. 2013. Vol. 65. P. 607–619. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-165

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВЕЩЕСТВ ГЛИКОПРОТЕИНОВОЙ И ПОЛИФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДНОГО И БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ *

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF GLYCOPROTEIN AND POLYPHENOLIC SUBSTANCES ON THE CONTENT OF LIPID AND PROTEIN COMPONENTS OF SOMATIC NERVES IN CASE OF INJURY

А. В. Заварыкина, М. В. Парчайкина, Э. С. Ревина, В. В. Ревин

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск

A. V. Zavarykina, M. V. Parchaykina, E. S. Revina, V. V. Revin

Ogarev Mordovia State University, Saransk

✉ zavaryckina.a@yandex.ru

Аннотация

Возрастает интерес к веществам, ускоряющим регенерацию нервов. В отличие от ресвератрола, ламинин изменяет фракции свободных жирных кислот (СЖК), диацилглицерина (ДАГ) и фосфатидилинозитола (ФИ), соотношение I_{2940}/I_{2853} КР-спектра и содержания белка, что, вероятно, указывает на активацию им сигнального пути, опосредованного фосфоинозитид-специфичной фосфолипазой С, и стимуляцию белкового синтеза.

Abstract

There is a growing interest in substances that accelerate nerve regeneration. Unlike resveratrol, laminin alters the fractions of free fatty acids (FFA), diacylglycerol (DAG) and phosphatidylinositol (PI), the ratio I2940/I2853 of the Raman spectrum and protein content, which probably indicates activation of the phosphoinositide-specific phospholipase C-mediated signaling pathway and stimulation of protein synthesis.

Повреждения соматических нервов сопровождаются сенсомоторным дефицитом и нейропатической болью, в результате чего наблюдается инвалидизация и полная потеря трудоспособности [1].

Известно, что ламинин обладает одной из наиболее важных функций — взаимодействует с рецепторами, закрепленными в плазматической мембране клеток, прилегающих к базальным мембранам. Он играет структурную и сигнальную роль в регенерации: направляет рост аксонов, способствует адгезии и миграции Шванновских клеток, а также усиливает восстановление нейронов в периферической нервной системе.

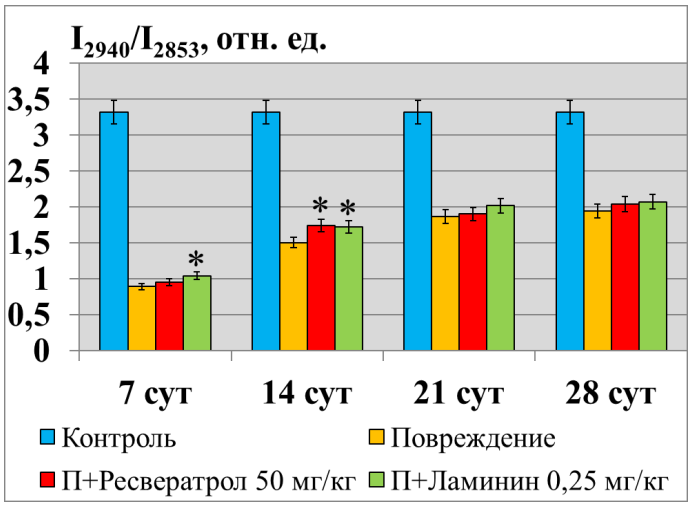
Ресвератрол — природный полифенол, он обладает противовоспалительным, антиоксидантным и нейропротекторным действием, способен запускать сигнальный путь SIRT1. Кроме того, в литературе сообщается, что за счет повышения экспрессии НО-1 вследствие активации внутриклеточного сигнального пути PI3K/AKT/Nrf2 происходит регенерация и рост аксонов [2].

Цель работы — изучение липидного состава, физико-химического состояния мембраны нервного волокна и содержания общего белка поврежденных соматических нервах при внутримышечном введении ресвератрола и ламинина.

Объектом исследования служили седалищные нервы белых крыс линии Wistar массой 250–300 г. Животным 1-й опытной группы осуществляли перерезку седалищного нерва. Животным 2-й и 3-й опытных групп после перерезки ежедневно внутримышечно вводили ламинин и ресвератрол в концентрациях 0,25 и 50 мг/кг соответственно. Животных выводили из эксперимента через 7, 14, 21 и 28 суток. Экстракцию липидов из нервной ткани проводили по методу Блайя — Дайера [3]. Разделение фосфолипидов осуществляли методом одномерной тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей хлороформ/метанол/вода/аммиак [4]. Для разделения ДАГ и СЖК использовали систему гептан / диэтиловый эфир / ледяная уксусная кислота [5]. Количественное определение липидов осуществляли денситометрическим методом на автоматизированном комплексе CAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария). Концентрацию белка в полученных пробах измеряли методом Лоури с помощью спектрофотометра (Shimadzu, Япония) [6]. Изменение физико-химического состояния липидного бислоя

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (код научной темы FZRS-2024-0005) в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (создание новых молодежных лабораторий).

© А. В. Заварыкина, М. В. Парчайкина, Э. С. Ревина, В. В. Ревин, 2025



Влияние ресвератрола и ламинина на изменение отношения интенсивности полос I_{2940}/I_{2853} КР-спектра проксимального участка седалищного нерва после его повреждения. Отн. ед. — относительные единицы, все планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего значения (n = 10) в % от контроля; * — достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$

нерва оценивали с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния на рамановском спектрометре *in via* Basis фирмы Renishaw (Англия) [7].

Было показано, что перерезка нерва сопровождается увеличением уровня СЖК и ФИ и уменьшением ДАГ в проксимальном его отрезке по сравнению с контролем. Достоверное снижение СЖК относительно повреждения наблюдается в опыте с ламинином на протяжении всего периода наблюдения. Увеличение уровня ДАГ по сравнению с травмой отмечается к 21-м и 28-м суткам при введении ламинина. Содержание ФИ также коррелирует с уровнем ДАГ и СЖК и снижается на 15,4 % спустя 21-е сутки эксперимента относительно повреждения.

На следующем этапе с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния мы провели оценку физико-химического состояния мембраны нервного проводника (см. рисунок). В серии опытов с ламинином соотношение интенсивности пиков I_{2940}/I_{2853} возрастает, свидетельствуя о стабилизации липидного и белкового состава мембран соматических нервов, что является необходимым для восстановления функционирования нервных проводников.

Эти данные подтверждаются изменением содержания общего белка: в серии опытов с введением ресвератрола и ламинина его уровень возрастает на 12,7 и 31,5 % соответственно по сравнению с повреждением к 28-м суткам наблюдения.

Таким образом, введение ламинина способствует выраженному изменению фракций СЖК, ДАГ и ФИ по сравнению с ресвератролом, что может быть обусловлено активацией сигнального пути фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С. С другой стороны, увеличение показателя I_{2940}/I_{2853} КР-спектра и содержания общего белка при его действии указывает на активацию белкового синтеза, в результате чего наблюдается восстановление как липидного, так и белкового компонента нервов, что свидетельствует о наличии у ламинина стимулирующего действия на регенерацию поврежденных нервных проводников. Вероятно, действие ресвератрола обусловлено отличными от ламинина сигнальными каскадами и требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Dahlin L. B. The Dynamics of Nerve Degeneration and Regeneration in a Healthy Milieu and in Diabetes // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. DOI: 10.3390/ijms242015241. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37894921/ (дата обращения: 29.06.2025).

2. Hui, Y., Chengyong, T., Cheng L. et al. Resveratrol Attenuates the Cytotoxicity Induced by Amyloid-β1-42 in PC12 Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway // Neurochem Res. 2018. Vol. 43. DOI: 10.1007/s11064-017-2421-7. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29090409/ (дата обращения: 29.06.2025).

3. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. Vol. 37, iss. 8. DOI: 10.1139/o59-099. URL: https://cdnsciencepub.com/doi/10.1139/o59-099?cookieSet=1 / (дата обращения: 30.06.2025).

4. Scharer C. Diplomarbeit Vergleich von HPLC-ELSD und moderener TLC in der heutigen Phospholipid-Qualiatskontrolle // Fachhochschule Beider Basel. 2001.

5. Findlay D. B., Evans W. G. Biological membranes. Methods // Mir Publishers. 1990.

6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193.

7. Fu Y., Frederick T. J., Huff T. B. et al. Paranodal myelin retraction in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis visualized by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy // J. Biomed. Opt. 2011. Vol. 10. DOI: 10.1117/1.3638180. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22029353/ (дата обращения: 10.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-166

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПИГМЕНТА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ *

PHOTODYNAMIC ACTION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PIGMENT ON BACTERIAL BIOFILMS

А. Т. Ишемгулов, О. К. Давыдова, М. Е. Григорьев, В. А. Абдрахманова, С. Н. Летута

Оренбургский государственный университет

A. T. Ishemgulov, O. K. Davydova, M. E. Grigoriev, V. A. Abdrakhmanova, S. N. Letuta

Orenburg State University

✉ azamat.ischemgulov@yandex.ru

Аннотация

Исследовалась выживаемость бактерий *P. aeruginosa* в биопленках в результате фотодинамического действия вырабатываемого бактериями пигмента. Из пигментированных бактерий выделен бактериальный пигмент, который приблизительно в 3,5 раза снизил жизнеспособность непигментированного штамма после светового облучения. Также обсуждаются возможности применения бактериального пигмента в сочетании с экзогенными сенсибилизаторами.

Abstract

The survival of *P. aeruginosa* bacteria in biofilms was studied as a result of the photodynamic action of a pigment produced by the bacteria. A bacterial pigment was isolated from pigmented bacteria, which reduced the viability of the non-pigmented strain by approximately 3.5 times after light irradiation. The possibilities of using the bacterial pigment in combination with exogenous sensitizers are also discussed.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* вызывают у человека ряд тяжелых инфекций и достаточно устойчивы к традиционным антибиотикам во многом из-за интенсивного образования биопленок [1, 2]. Антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ) может воздействовать на биопленки за счет генерации активных форм кислорода, которые повреждают клетки бактерий и биопленочный матрикс, не вызывая резистентности. Кроме того, аФДТ действует локально, минимизируя побочные эффекты, и может сочетаться с традиционными методами лечения для повышения эффективности [3]. В настоящей работе исследовалась фотодинамическая активность бактериального пигмента, вырабатываемого *P. aeruginosa*, в отношении этих микроорганизмов, как пигментированного, так и лишенного пигмента штаммов.

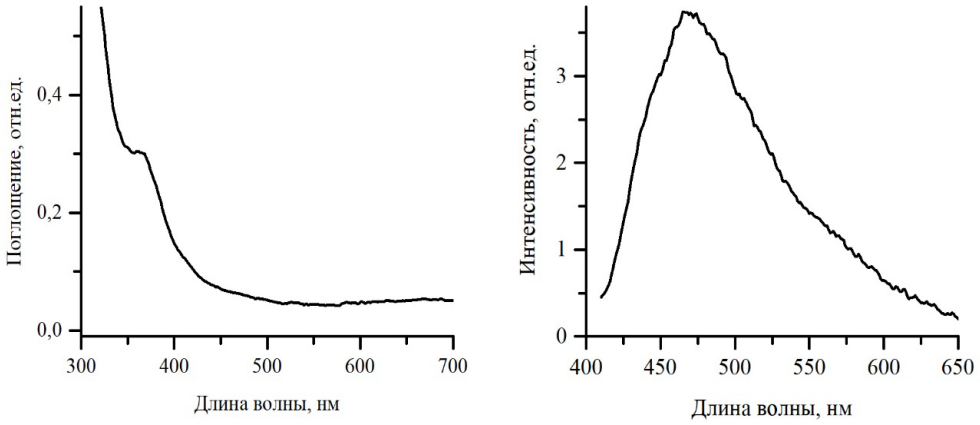
При фильтрации суспензии пигментированного штамма *P. aeruginosa* через бактериальный фильтр был выделен раствор с пигментом. При исследовании его спектров поглощения был выявлен максимум в области 370–380 нм, характерный для бактериального пигмента пиовердина (см. рисунок). Была также обнаружена люминесценция пиовердина на 470 нм.

Биопленки для эксперимента выращивались на смеси ЦПХ-бульона и ЦПХ-агара, причем пропорциональность смеси подбиралась таким образом, чтобы при температуре инкубации среда оставалась жидкой (таким образом создаются условия для роста биопленки на поверхности), а при комнатной температуре среда застывала для формирования твердой подложки (в таком случае можно изготовлять множество одинаковых образцов биопленки). Для фотодинамического воздействия образцы биопленки размещались в лунки стандартного планшета. Фотодинамическое воздействие на все образцы оказывалось с помощью лампы КГМ-150, плотность мощности 0,05 Вт/см^2, продолжительность воздействия 15 мин. Далее образцы биопленок помещались в пробирку, суспензировались, полученная суспензия разводилась и высевалась для подсчета КОЕ.

Нативные биопленки (как пигментированного, так и непигментированного штаммов) не проявляли значимого снижения жизнеспособности при облучении без фотосенсибилизатора. Количество КОЕ из непигментированных биопленок, инкубированных как в растворе пигмента, так и в физрастворе (без светового воздействия), практически одинаково, что исключает значимое темновое действие пигмента.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSGU-2023-0003).

© А. Т. Ишемгулов, О. К. Давыдова, М. Е. Григорьев, В. А. Абдрахманова, С. Н. Летута, 2025



Спектры поглощения (*слева*) и люминесценции на длине волны 380 нм (*справа*) выделенного из суспензии бактериального пигмента

Фотодинамический эффект наблюдается только при облучении непигментированных биопленок, предварительно инкубированных с пигментом: в этом случае количество КОЕ снижается приблизительно в 4 раза (см. таблицу).

КОЕ, полученные при фотодинамической обработке пигментированных и непигментированных биопленок, а также непигментированных биопленок с добавленным пигментом

Схема						
Обозначение	Контроль пигм.	Пигм. облуч.	Контроль непигм.	Непигм. облуч.	Добавл. пигм. контроль	Добавл. пигм. облуч.
КОЕ	855 ± 86	710 ± 53	835 ± 72	800 ± 58	733 ± 68	235 ± 34

После облучения выживаемость клеток естественно пигментированного штамма составляет ~ 90 %, тогда как у непигментированного штамма с добавленным пигментом — менее 25 %. Поскольку концентрация выделенного пигмента в эксперименте не определялась, невозможно установить, была ли она эквивалентна его содержанию в естественно пигментированных биопленках. Если концентрация сенсибилизатора в образцах с добавленным пигментом существенно превышала таковую в естественно пигментированных биопленках, наблюдаемая разница в эффективности может быть объяснена именно этим фактором. Несмотря на слабую собственную фотодинамическую активность пигмента в отношении бактериальных клеток (его основная роль, вероятно, заключается в конкурентном подавлении других микроорганизмов в биопленках при дефиците ресурсов [4]), гипотеза состоит в том, что под воздействием света и внешнего фотодинамического стресса пигмент усиливает инактивацию пигментированных клеток. Наблюдаемое несколько меньшее выживание пигментированных бактерий при равных условиях не противоречит этой идее. Полученные результаты имеют высокий потенциал для внедрения в клиническую практику в качестве нового метода лечения инфекций, связанных с медицинскими устройствами (катетерами, имплантатами, протезами), и хронических ран (диабетических, ожоговых), развивая новые методы борьбы с биопленкообразованием.

Литература

1. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents // Nat. Rev. Drug Discov. 2003. Vol. 2. P. 114–122.

2. Sharma G., Rao S., Bansal A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets // Biologicals. 2014. Vol. 42 (1). P. 1–7.

3. Vinagreiro C. S. et al. Antibacterial Photodynamic Inactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria and Biofilms with Nanomolar Photosensitizer Concentrations // ACS Infect. Dis. 2020. Vol. 6. P. 1517–1526.

4. Piel J., Vollenweider V., Polymenidou M. et al. Antimicrobial activity of iron-depriving pyoverdines against human opportunistic pathogens // eLife. 2024. Vol. 13.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-167

МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ ДОРСАЛЬНОЙ КАМЕРЫ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ *

MOUSE MODEL OF THE DORSAL CHAMBER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY

А. М. Кольченко, А. А. Власов, М. Е. Степанов, Т. В. Егорова, Е. В. Хайдуков, Р. А. Акасов

Московский педагогический государственный университет

A. M. Kolchenko, A. A. Vlasov, M. E. Stepanov, T. V. Egorova, E. V. Khaydukov, R. A. Akasov

Moscow Pedagogical State University

✉ anya.kolchenko@gmail.com

Аннотация

Развитие резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам и антибиотикам — серьезный вызов для здравоохранения. Резистентные штаммы устойчивы к терапии и часто обладают высокой вирулентностью, что может приводить к развитию опасных внутрибольничных инфекций. Перспективным методом лечения является фотодинамическая терапия. Настоящая работа посвящена разработке мышиной модели дорсальной камеры для проведения фотодинамической терапии.

Abstract

The development of microbial resistance to antimicrobial drugs and antibiotics is a serious challenge for healthcare. Resistant strains are resistant to therapy and often have high virulence, which can lead to the development of dangerous nosocomial infections. Photodynamic therapy is a promising method of treatment. This work is devoted to the development of a mouse model of the dorsal chamber for photodynamic therapy.

Антибактериальная фотодинамическая терапия (аФДТ) представляет собой перспективный подход для терапии антибиотикорезистентных инфекций. Метод основан на использовании фотосенсибилизаторов (ФС), которые при облучении светом заданного диапазона могут генерировать токсичные для патогенов активные формы кислорода (АФК) и (или) свободные радикалы. Благодаря тому, что токсический эффект АФК и свободных радикалов неспецифичен, метод эффективен в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [1]. Использование света для активации ФС позволяет обеспечивать адресное воздействие терапии только на пораженную ткань и снизить побочные эффекты. Для изучения применения фотосенсибилизаторов в медицине нужно проводить исследования иммунологического ответа организма на введенный препарат. Для понимания этих механизмов необходимо разработать мышиные модели, имитирующие инфекции человека.

Цель настоящей работы — разработать мышиную модель бактериально-обсемененной раны для дальнейшего использования дорсальной камеры для проведения фотодинамической терапии.

В качестве основы модели бактериально-обсемененной раны была использована дорсальная камера, разработанная сотрудниками кафедры теоретической физики МПГУ [2]. После имплантации дорсальной камеры с одной из сторон кожной складки устанавливали покровное стекло без вырезания кожи, со второй же стороны верхний слой кожи глубиной около 150 мкм или 1 мм удаляли при помощи микрохирургических инструментов. Для моделирования бактериального воспаления использовали ампициллинрезистентные бактерии *Escherichia coli* с флуоресцентным белком mKate, которые высаживали на раневую поверхность в виде суспензии в стерильном физрастворе. Наличие бактерий в ране фиксировали по уровню свечения через флуоресцентный микроскоп с набором фильтров.

На модели с вырезом 1 мм уже к 8-му дню микроскопирование было затруднено из-за объема скопившегося экссудата. Подсаженные бактерии вызвали сильную воспалительную реакцию в этой модели, к 15-му дню было невозможно ориентироваться по сосудистой сетке из-за нечеткости картинки, бактерии можно было флуоресцентно распознать только при рассмотрении мазка экссудата в отличии от первого объекта с менее глубоким срезом в 150 мкм, где сосуды и бактерии были различимы при микроскопии. Однако важно, что на любом из исследуемых экспериментальных животных в течение всего эксперимента наблюдалась флуоресценция бактерий, что указывает на успешность создания бактериально-обсемененной раны.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства просвещения РФ «Физика наноструктурированных материалов и высокочувствительная сенсорика: синтез, фундаментальные исследования и приложения в фотонике, науках о жизни, квантовых и нанотехнологиях» (тема № 124031100005-5).

© А. М. Кольченко, А. А. Власов, М. Е. Степанов, Т. В. Егорова, Е. В. Хайдуков, Р. А. Акасов, 2025

Таким образом, были определены оптимальные условия для создания мягкого ответа организма на введение *E. coli* и для успешной визуализации бактерий в бактериально-обсемененной ране.

Для тестирования работоспособности модели был проведен эксперимент по ФДТ с использованием разработанной модели. Для этого на раневую поверхность была поставлена капля суспензии ампициллинрезистентных бактерий *E. coli*, далее по истечении трех дней в рану добавили рибофлавин в концентрации 2 мг/мл и провели ФДТ с использованием диода 530 нм с дозой облучения 12 Дж. Рибофлавин (витамин B2) был использован в качестве модельного ФС, так как является природным соединением, которое давно используется в клинике, является нетоксичным веществом и обладает фотодинамическими свойствами при облучении УФ и синим светом [3]. До и после терапии фиксировали уровень свечения бактерий в ране с помощью снимков через флуоресцентный микроскоп с набором фильтров. Снимки обрабатывали в программном обеспечении ImageJ. Таким образом, было выявлено, что уровень свечения бактерий, отражающий их жизнеспособность, снизился на 32 %, что подтверждает успешность разработанной методики.

В результате проведенной работы была разработана мышиная модель бактериально-обсемененной раны с использованием дорсальной камеры, а также проведен пилотный эксперимент, демонстрирующий успешность применения модели для ФДТ.

Литература

1. Saha M., Sarkar A. Review on multiple facets of drug resistance: A rising challenge in the 21st century // J. Xenobiotics. 2021. Vol. 11, No. 4. P. 197–214.

2. Stepanov M. E., Vlasov A. A. Demina P. A. et al. Intravital Microscopy — A Window Into The World Of Bioprocesses // Photonics Russia. 2024. Vol. 2024, No. 8. P. 640–648.

3. Insińska-Rak M., Sikorski M., Wolnicka-Glubisz A. Riboflavin and Its Derivates as Potential Photosensitizers in the Photodynamic Treatment of Skin Cancers // Cells. 2023. Vol. 12, No. 18.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-168

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ДИНАМИКИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ I *SACCHAROMYCE CEREVISIAE* В СИСТЕМАХ С ДМСО И ДИЗЕЛЬНЫМ ТОПЛИВОМ*

STRUCTURAL DYNAMICS OF ALCOHOL DEHYDROGENASE I FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN DMSO AND DIESEL FUEL SYSTEMS

А. С. Колян[1], А. А. Деева[1,2]

[1]*Сибирский федеральный университет, Красноярск*
[2]*Сургутский государственный университет*

A. S. Kolyan[1], A.A. Deeva[1,2]

[1]*Siberian Federal University, Krasnoyarsk*
[2]*Surgut State University*

✉ kolyanani98@gmail.com

Аннотация

Алкогольдегидрогеназа I (АДГ I) дрожжей может быть использована в составе ферментативных тест-систем для экологического мониторинга как индикатор загрязнений среды компонентами дизельного топлива. В настоящей работе использовался метод молекулярной динамики для анализа влияния этих соединений и ДМСО на структурную динамику АДГ I.

Abstract

Yeast alcohol dehydrogenase I (ADH I) can be used as a part of enzymatic test systems for environmental monitoring, serving as an indicator of contamination by diesel fuel-derived compounds. In this study, molecular dynamics simulations were conducted to investigate the effects of this compounds, along with DMSO, on the structural dynamics of ADH I.

Алкогольдегидрогеназа I (АДГ I) дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) катализирует обратимую окислительно-восстановительную реакцию с участием ацетальдегида и NAD(P)H. Благодаря способности эффективно обеспечивать взаимопревращение NAD(P)H и NAD(P) + этот белок используется в составе сопряженных ферментативных цепей при разработке биотестов. Наиболее известна триферментная система АДГ I + оксидоредуктаза + люцифераза, применяемая для анализа различных сред, включая почву. В настоящее время ведется разработка методики определения нефтепродуктов в почвах с использованием этой триферментной системы, где экстракция проб осуществляется с применением диметилсульфоксида (ДМСО).

Для повышения надежности биотестов необходимо учитывать влияние исследуемых веществ на каждый фермент системы. АДГ I представляет особый интерес, так как является металлопротеином с тетрамерной структурой, чувствительной к изменениям молекулярного окружения. Перспективным подходом к анализу таких эффектов является использование методов молекулярной динамики (МД), позволяющих оценить конформационные изменения отдельных участков белка.

Учет ионов металлов в структуре белков представляет собой отдельную и важную задачу при моделировании МД. Каждая из субъединиц АДГ I содержит два центра координации ионов цинка: каталитический и структурный. Каталитический ион Zn^{2+} находится в классической тетраэдрической координации с остатками Cys43, His66 и Cys153, а также Thr45 или Glu67 в зависимости от конформации субъединицы («открытая» или «закрытая»). Структурный ион цинка участвует в стабилизации глобальной структуры и координируется остатками Cys90, Cys100, Cys103 и Cys111. Для адекватного описания координационного центра в МД были задействованы модифицированные параметры силового поля для вышеуказанных аминокислотных остатков [1, 2].

Моделирование проводилось в программном пакете GROMACS 2024.5 с использованием силового поля AMBER99SB-ILDN и модели воды TIP3P. Исследуемый белок (PDB ID: 6W5Z) помещали в модельный бокс с водой, 10%-м раствором ДМСО или смесью воды, 10%-м ДМСО и 1,8 % компонентов дизельного топлива. Температура моделирования составляла 300 K, давление — 1 атм, длительность — 100 нс; для каждой системы выполнялось три независимых запуска.

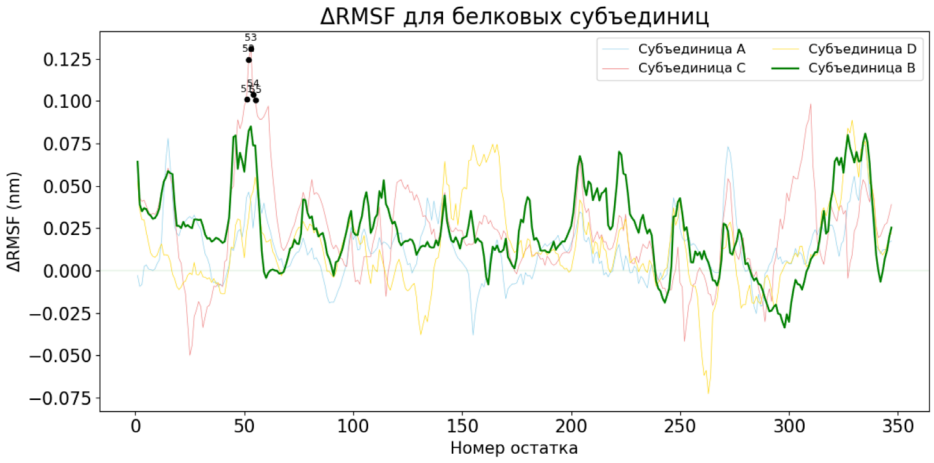
* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-14-20030).
© А. С. Колян, А. А. Деева, 2025

Для оценки влияния растворителя рассчитывали параметры, характеризующие стабильность структуры (см. таблицу). Показано, что добавление ДМСО существенно не влияет на структуру: изменения RMSD, Rg и SASA минимальны, что указывает на сохранение компактности структуры белка.

Среднеквадратичное отклонение (RMSD), радиус гирации (Rg) и площадь поверхности, доступная растворителю (SASA) АДГ I. Средние значения ± стандартное отклонение (*n* = 3)

Растворитель	Rg, нм	RMSD, нм	SASA, нм^2
Вода	2,81 ± 0,01	0,21± 0,01	525,2 ± 8,1
Раствор ДМСО	2,82 ± 0,02	0,21± 0,04	534,5 ± 12,3
Раствор ДМСО и дизельного топлива	3,34 ± 0,01	0,20± 0,03	535,1 ± 7,9

Однако добавление дизеля в систему приводит к увеличению радиуса гирации на 5,2 ± 0,2 Å, что может свидетельствовать о частичном нарушении упаковки гидрофобных участков. Отсутствие значимых изменений в значении SASA (ΔSASA = 0,6 нм^2) позволяет исключить глобальное разворачивание белка. Анализ ΔRMSF выявил стабильную динамику цепей белка во всех условиях, однако в растворе с ДМСО цепь C демонстрировала повышенную гибкость в области активного центра (см. рисунок). Это может повлиять на связывание субстрата или кофермента и требует дальнейшего изучения.



Изменение среднеквадратичных флуктуаций (ΔRMSF) Cα-атомов основной цепи в системе «вода + ДМСО» по сравнению с системой в воде без примесей

Таким образом, моделирование выявило повышение локальной подвижности отдельных участков АДГ I, что может отражаться на активности фермента и должно учитываться при создании биосенсоров.

Литература

1. Macchiagodena M. et al. Upgraded AMBER force field for zinc-binding residues and ligands for predicting structural properties and binding affinities in zinc-proteins // ACS omega. 2020. Vol. 5, No. 25. P. 15301–15310.

2. Macchiagodena M. et al. Upgrading and validation of the AMBER force field for histidine and cysteine zinc (II)-binding residues in sites with four protein ligands // J. Chem Inf. Model. 2019. Vol. 59, No. 9. P. 3803–3816.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-169

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ С РАЗЛИЧНЫМ ЧИСЛОМ ИМПУЛЬСОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

EFFECT OF PULSED MAGNETIC FIELD WITH DIFFERENT NUMBER OF PULSES ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Д. А. Копылова[1], Н. А. Роденко[2], Т. И. Васильева[1,2], О. В. Бледных[2], В. А. Глущенков[2]

[1]*Самарский государственный технический университет*
[2]*Самарский федеральный исследовательский центр РАН*

D. A. Kopylova[1], N. A. Rodenko[2], T. I. Vasilieva[1,2], O. V. Blednykh[2], V. A. Glushchenkov[2]

[1]*Samara State Technical University*
[2]*Samara Federal Research Center RAS*

✉ t.rodenko@mail.ru

Аннотация

В работе исследовано действие импульсного магнитного поля высокой напряженности при B = 2,21 ÷ 7,10 Тл с различным числом импульсов на биологическую активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Отмечается снижение количества дрожжевых клеток на 53–63 % при воздействии с B = 5,21 ÷ 7,10 Тл с числом импульсов n = 3 ÷ 5, при B = 7,10 Тл с однократной обработкой и с дальнейшим перерывом в 60 с с последующей подачей импульсов показал стимулирующий эффект на 32 %.

Abstract

The work studies the effect of a high-intensity pulsed magnetic field at B = 2,21 ÷ 7,10 T with different numbers of pulses on the biological activity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. A decrease in the number of yeast cells by 53–63 % was noted when exposed to B = 5,21 ÷ 7,10 T with a number of pulses n = 3 ÷ 5, while at B = 7,10 T with a single treatment and a further break of 60 seconds with subsequent supply of pulses it showed a stimulating effect of 32 %.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* широко используются как модельный организм для исследования воздействия магнитных полей благодаря хорошо изученной генетике и метаболизму. Исследования магнитных полей на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* помогают понять молекулярные механизмы клеточной реакции и открывают новые возможности для использования магнитных полей в биотехнологии и медицине.

Электромагнитные поля в диапазоне B от мкТл и мТл могут оказывать стимулирующее действие на рост дрожжевых клеток. В работе [1] оценивалась жизнеспособность дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* после воздействия на них переменным магнитным полем (f = 50 Гц, B = 1 ÷ 30 мТл, τ = 60 мин), где наблюдался стимулирующий эффект (B = 5 мТл) и ингибирующее действие (B = 30 мТл).

Магнитное поле может повышать устойчивость растений к заболеваниям. Существует запатентованный метод обработки растений при применении последовательности импульсов к растущим растениям или их семенам в импульсном магнитном поле (ИМП) при f = 1 ÷ 100 Гц в результате чего повышается устойчивость к заболеваниям [2].

Цель работы заключалась в экспериментальной проверке ингибирования дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* под воздействием ИМП высокой напряженности.

Пробирки с исследуемыми образцами располагались равномерно в центре цилиндрического индуктора диаметром 18 мм и длиной рабочей зоны l = 120 мм с индуктивностью L = 13,52 мГн, частотой разрядного тока f = 15,7 кГц. Воздействие на культуру дрожжей проводилось на установке МИУ-БИО-5 (СамНЦ РАН, Россия). Обработка клеток осуществлялась последовательными импульсами n = 3 ÷ 10 и интервалом между ними 3 с при B = 2,21÷7,10 Тл. При воздействии с B = 7,10 Тл с количеством импульсов n = 3 сначала проводилась обработка при однократном воздействии с дальнейшим перерывом 60 с с последующей подачей двух импульсов.

Нативная культура дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* выращивалась на жидкой картофельно-глюкозной питательной среде в течение 2 суток при температуре 27 °C. Отбиралась суспензия клеток объемом 5 мл для последующего воздействия ИМП. После обработки суспензия инкубировалась 24 ч при температуре 27 °C, затем проводился подсчет и оценка жизнеспособности дрожжевых клеток. Для подсчета клеток использовали

© Д. А. Копылова, Н. А. Роденко, Т. И. Васильева, О. В. Бледных, В. А. Глущенков, 2025

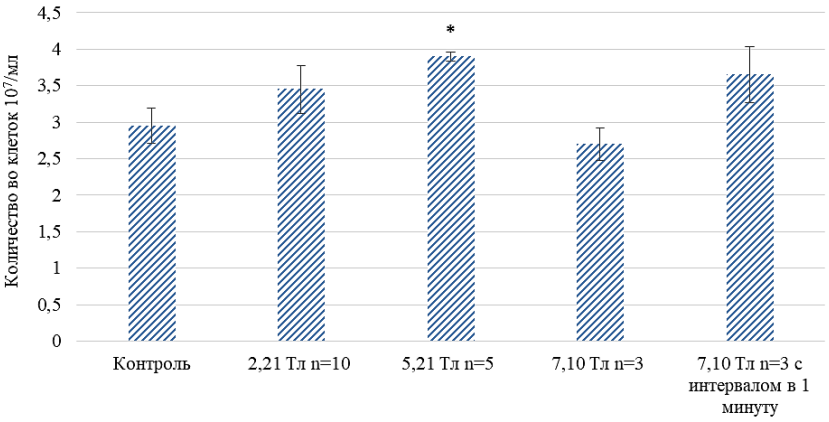


Рис. 1. Зависимость общего количества дрожжевых клеток от величины индукции магнитного поля (* — $p < 0,05$)

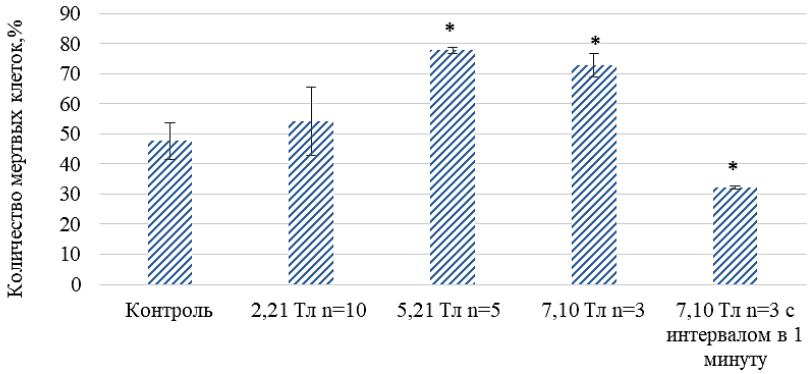


Рис. 2. Зависимость количества мертвых клеток от величины индукции магнитного поля (* — $p < 0,05$)

счетную камеру Горяева, разводя суспензию в дистиллированной воде в соотношении 1 : 10. Для оценки жизнеспособности дрожжей отбирали 50 мкл культуральной жидкости и окрашивали 0,01%-м раствором метиленового синего для выявления погибших клеток. Подсчет проводили при 1000× увеличении микроскопа.

Влияние ИМП на дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* носит нелинейный характер. Отмечается увеличение общего числа клеток на 28 % при воздействии с $B = 5,21$ Тл и $n = 5$ (рис. 1).

При подсчете жизнеспособных дрожжевых клеток при окрашивании метиленовым синим зарегистрирован ингибирующий эффект после воздействия ИМП с $B = 5,21 \div 7,21$ Тл с числом импульсов $n = 3 \div 10$ (рис. 2).

Уменьшение количества клеток на 63 % начинается при $B = 5,21$ Тл с непрерывным воздействием при $n = 5$. При обработке ИМП дрожжевой культуры с $B = 7,10$ Тл при непрерывном воздействии с числом импульсов $n = 3$ происходило снижение жизнеспособности на 53 %. Получены результаты о снижении количества мертвых клеток на 32 % в условиях ИМП при $B = 7,10$ Тл при однократном воздействии $n = 1$ с дальнейшим перерывом 60 с с последующей подачей импульсов $n = 2$.

Полученные результаты представляют интерес для исследования воздействия ИМП на патогенные микроорганизмы, поскольку магнитные поля могут угнетать рост и размножение грибковых патогенов, а также активировать иммунный ответ организма, что способствует борьбе с инфекцией. Таким образом, использование магнитных полей для обеззараживания от грибковых инфекций является перспективной областью, которая требует дальнейших исследований для подтверждения эффективности и разработки практических методов.

Литература

1. Беспалова С. В., Ткаченко Д. С., Эренбург О. В. Влияние переменного магнитного поля на жизнеспособность и скорость размножения дрожжевых клеток после их инкубации // Донецкие чтения: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности: Межд. науч. конф. (27–28 октября): тез. докл. Донецк: ДонНУ. 2022. С. 5–7.

2. Gleim P. Method for the treatment of plants using electromagnetic // Patent Application US2011/0283607 A1, A01G 7/04, publ. 2011.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-170

НЕТРАДИЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ СЭМ КАК ВОЗМОЖНОСТЬ УВЕЛИЧЕНИЯ ИНФОРМАТИВНОСТИ ПАЛИНОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА

THE UNCONVENTIONAL SEM STUDIES AS A WAY TO INCREASE THE INFORMATIVE POTENTIAL OF PALYNOLOGICAL METHOD

Г. М. Левковская[1], Е. С. Чавчавадзе[2], А. Н. Боголюбова[2], Е. В. Беляева[1], С. Н. Лисицын[1], М. Ю. Степанова[1], А. К. Каспаров[1]

[1]*Институт истории материальной культуры РАН, Санкт-Петербург*
[2]*Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург*

G. M. Levkovskaya[1], E. S. Chavchavadze[2], A. N. Bogolyubova[2], E. V. Belyaeva[1], S. N. Lisitsyn[1], M. Y. Stepanova[1], A. K. Kasparov[1]

[1]*Institute for the History of Material Culture RAS, Saint Petersburg*
[2]*Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg*

✉ ggstepanova@yandex.ru

Аннотация

Предлагается в дополнение к традиционным СЭМ-исследованиям отдельных палиноморф исследовать и документировать с помощью СЭМ комплексы пыльцы, захороненные в пробирочных мацератах отложений. СЭМ позволяет: 1) получать изображения палинокомплексов — «кладбищ» пыльцы различных таксонов растений; 2) обнаруживать мельчайшие палеоботанические остатки внутри палинологических «кладбищ».

Abstract

In addition to traditional SEM studies of individual palynomorphs, it is proposed to use SEM for examination and documentation of pollen complexes from the test tube macerates of sediments. It allows: 1) to obtain SEM micrographs of the "pollen cemeteries" of different plant taxa; 2) to detect the smallest paleobotanical remains between numerous pollen grains.

Традиционно палиноморфологи используют СЭМ для исследования отдельных палиноморф, а палеопалинологи, за редким исключением, не используют СЭМ из-за сложности подготовки ископаемого материала к СЭМ-исследованиям.

Предлагается кроме отдельных палиноморф исследовать с помощью СЭМ пробирочные мацераты отложений с комплексами пыльцы. Методика подготовки столиков для СЭМ-исследований мацератных осадков такая же, как и для исследований отдельных палиноморф, — напыление столиков смесью золота с палладием. Различается лишь объект исследований — палинокомплексы вместо отдельных пыльцевых зерен.

Нами были получены традиционные палинологические данные и СЭМ-микрографии отдельных палиноморф и мацератных комплексов отложений для многослойных и хорошо стратифицированных стоянок средневековья — Старая Ладога; палеолита — Королево (Украина), Кетросы (Молдова), Бетово, Костенки 1, 12, 14, Борщево (Русская равнина); пещерных мустьерских стоянок — Денисова (Алтай) и Кударо I, Кударо III, Ахштырская, Воронцовская, Мезмайская, Матузка, Баракаевская и Монашеская (Кавказ), а также СЭМ-данные для одного из древнейших памятников Европы — пещеры Атапуэрка в Испании. Опубликована лишь небольшая часть СЭМ-материалов. Анализ СЭМ-микрографий из вышеперечисленных стоянок показал, что особо значимые данные получены для пещерных стоянок Монашеская, Баракаевская и Атапуэрка.

В Монашеской пещере [1], по данным трасолога В. Е. Щелинского, более 65,2 % орудий имеют следы обработки древесины. Но из этой пещеры в результате многолетних тщательнейших раскопок не удалось набрать даже несколько граммов углей, необходимых для радиоуглеродных датировок, а имеющиеся даты получены по костям [2]. СЭМ-исследование мацератного комплекса позволило получить для этой пещеры две СЭМ-микрографии (рис. 1) фрагментов пор древесины сосны и ели, определенных Е. С. Чавчавадзе [3]. Сейчас хвойные леса растут значительно выше пещеры, которая располагается в поясе широколиственных лесов Кавказа.

© Г. М. Левковская, Е. С. Чавчавадзе, А. Н. Боголюбова, Е. В. Беляева, С. Н. Лисицын, М. Ю. Степанова, А. К. Каспаров, 2025

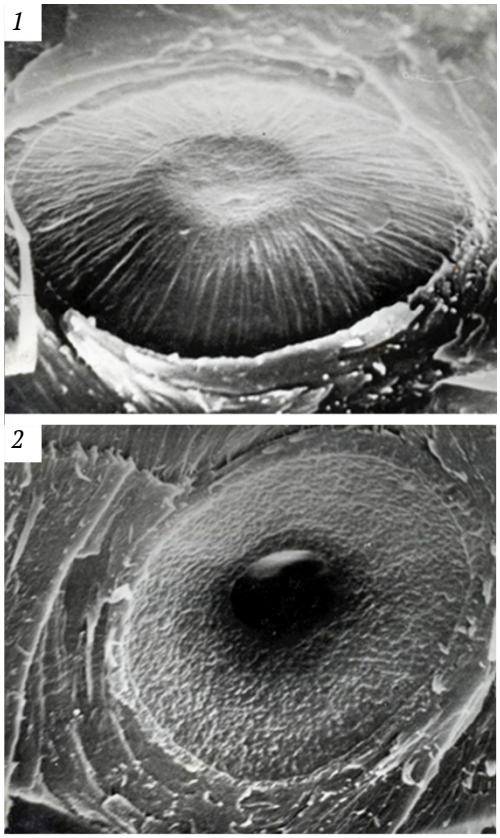


Рис. 1. Трахеиды древесины (определение Е. С. Чавчавадзе), обнаруженные на СЭМ-микрографии, полученной при исследовании пробирочных мацератов отложений. Монашеская мустьерская пещерная стоянка на Кавказе. Раскопки В. П. Любина и Е. В. Беляевой. СЭМ (6600×). *1* — сосна *Pinus* sp., *2* — ель *Picea* sp.

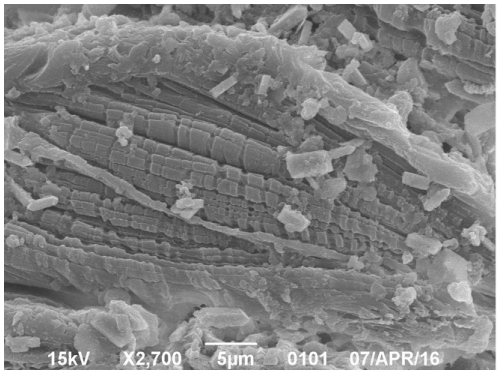


Рис. 2. Микроостатки древесины грецкого ореха *Juglans* sp. (определение Е. С. Чавчавадзе), обнаруженные на СЭМ-микрографии, полученной при исследовании пробирочных мацератов горизонта красноцветов пещеры. Раннепалеолетическая пещерная стоянка Атапуэрка (Испания). Раскопки EPPC-2018. СЭМ (2700×)

В мощных толщах красноцветов из одного из древнейших палеолитических памятников Европы — пещеры Атапуэрка в Испании — никто вообще не находил пыльцу. СЭМ-исследования именно пробирочного мацерата [4] дало возможность получить изображения комплекса пыльцы и изображение микроостатка древесины грецкого ореха (рис. 2).

В Баракаевской пещере [5] удалось впервые получить СЭМ-изображение «кладбища» неразвитой ультракарликовой, сильно утонченной, трудно определимой даже до семейства пыльцы одновременно всех таксонов растений, которая является индикатором климатического экстремума эпохи неандертальцев: условия контакта степей, альпийского и субальпийского поясов гор по палинологическим, палеозоологическим и десквамационным данным [1]. Сейчас пещера располагается в поясе широколиственных лесов Кавказа.

В результате нетрадиционного подхода к СЭМ-исследованиям удалось получить СЭМ-изображения «кладбищ» тератоморфных пыльцевых зерен, полученных из высокорадиоактивных проб, отобранных с поверхности почвы на второй год после Чернобыльской катастрофы на расстоянии 10–22 км от ЧАЭС. В результате выполнено сравнение типов палинотертарных «ответов» репродуктивной сферы растений на чернобыльскую катастрофу и на климатические экстремумы эпохи неандертальцев [6–8].

Таким образом, нетрадиционное использование СЭМ для получения изображений не только отдельных палиноморф, но и «кладбищ» палинокомплексов прошлого и настоящего, значительно увеличивают информативность палинологического метода:

1) находить разнообразные, даже очень мелкие палеоботанические остатки среди кладбищ пыльцы;

2) уточнять палеоэкологические реконструкции;

3) документировать с помощью СЭМ-микрографий «кладбища» тератоморфных пыльцевых зерен, которые сформировались во время экологических экстремумов климатического генезиса прошлого и настоящего и техногенных катастроф.

Литература

1. Неандертальцы Гупсского ущелья на Северном Кавказе. Майкоп: Меоты, 1994. С. 163–164.

2. Беляева Е. В, Леонова Е. В., Любин В. П. и др. Палеоэкологическая динамика и обитание человека в Губском микрорегионе (Кубанский Кавказ) в среднем палеолите-мезолите // Адаптация культур палеолита-энеолита к изменениям природной среды на Северо-Западном Кавказе. СПб.: Теза, 2009. С. 27–46.

3. Чавчавадзе Е. С. Древесина хвойных. Л.: Наука. 1979. С. 192.

4. Левковская Г. М., Карцева Л. А., Чавчавадзе Е. С. и др. О получении информации об объектах собирательства каменного века с помощью СЭМ (данные по стоянкам: Баракаевская, Монашеская, Костенки 1/1, Борщево 5, Атапуэрка) // Стратегии жизнеобеспечения в каменном веке, прямые и косвенные свидетельства рыболовства и собирательства. Мат. межд. науч. конф. посвящ. 50-летию В. М. Лозовского. Санкт-Петербург, 15–18 мая 2018 г. СПб.: ИИМК РАН, 2018. С. 252–254. URL: https://www.old.archeo.ru/izdaniya-1/vagnejshije-izdanija/pdf/2018MatConf_Loz50.pdf (дата обращения: 11.07.2025).

5. Levkovskaya G., Lyubin V., Belyaeva E. Late Caucasian Neanderthals of Barakaevskaya Cave: Chronology, Palaeoecology and Palaeoeconomy (Chapter 16) // Caves in Context. The Cultural Significance of Caves and Rockshelters in Europe. Oxford: Oxbow Books, 2012. P. 225–253. URL: https://doi.org/10.2307/j.ctvh1djk4.20 (accessed: 11.07.2025).

6. Левковская Г. М., Шамаль Н. В., Орехова М. Г. и др. Типы палинотератных комплексов отложений из 30 км зоны Чернобыля и плейстоценовых климатических экстремумов // Чернобыль: 30 лет спустя. Мат. межд. науч. конф. (21–22 апреля 2016 г.). Гомель: НАН Беларуси, 2016. С. 135–140. URL: https://drive.google.com/file/d/0B6K-Pvik5WACNkZKa0JidHBNcjQ/view?usp=sharing (дата обращения: 11.07.2025).

7. Levkovskaya G., Shamal N., Bogolyubova A. et al. The SEM characteristics of the “cemeteries” of palynoterates formed under two local types of radioactive load near the Chernobyl NPP, under climatic extremes of the Neanderthal epoch, and under geomagnetic excursion Laschamp ~42 000 years ago // RAP Int. Conf. Radiat. Appl. Phys., Chem., Biol., Med. Sci., Eng. Environ. Sci. Conf. Proc. Granada, Spain, 2024. Vol. 9. P. 9. URL: https://www.rap-conference.org/24/virtual/RAP24-163_Levkovskaya_WEB_Final.pdf (accessed: 11.07.2025).

8. Левковская Г. М., Шамаль Н. В., Тарасевич В. Ф. и др. СЭМ-характеристика «кладбищ» тератоморфных пыльцевых зерен, сформировавшихся в условиях высочайшего радиационного загрязнения вблизи Чернобыльской АЭС // X Междунар. конф. молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2023. С. 362–366. URL: https://doi.org/10.25205/978-5-4437-1526-1-192 (дата обращения: 11.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-171

НЕЙРОСЕТЕВОЙ СКРИНИНГ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИНЕЙНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЯДА ПАУКА С АКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНОГО ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА *

NEURAL NETWORK SCREENING AND STRUCTURE-FUNCTION STUDY OF LINEAR PEPTIDES FROM SPIDER VENOM WITH ACTIVITY AGAINST METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS

П. А. Миронов[1,2], П. В. Дубовский[1], А. А. Баранова[1], В. А. Алферова[1], З. О. Шенкарев[1]

[1] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

P. A. Mironov[1,2], P. V. Dubovskii[1], A. A. Baranova[1], V. A. Alferova[1], Z. O. Shenkarev[1]

[1] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ pavel.mironov@student.msu.ru

Аннотация

Используя нейронную сеть, мы идентифицировали ряд пептидов из библиотеки фрагментов линейных пептидов из яда пауков, активных в отношении метициллинрезистентного золотистого стафилококка (MRSA). Используя ЯМР-спектроскопию для одного из этих пептидов, мы показали, что в основе активности лежит наличие в их структуре гидрофобной N-концевой спирали, которая обеспечивает заякоревание молекулы на поверхности анионной мембраны бактерий.

Abstract

Using a neural network, we identified a series of peptides from a library of linear peptide fragments derived from spider venom that exhibit activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). NMR study of one of these peptides revealed that its activity is underpinned by the presence of a hydrophobic N-terminal α-helix, which anchors the molecule on the surface of the anionic bacterial membrane.

Проблема распространения антибиотикорезистентных штаммов бактерий становится все более актуальной. Особую угрозу представляет метициллинрезистентный золотистый стафилококк (MRSA). Для борьбы с ним надежды возлагаются на поликатионные мембраноактивные линейные пептиды (ЛП), присутствующие в яде пауков. ЛП способны дестабилизировать плазматическую мембрану бактерий, нарушая ее проницаемость и вызывая их гибель [1]. Именно они способны стать основой для новых эффективных антибактериальных препаратов. В рамках исследования была предложена следующая стратегия: 1) создание библиотеки фрагментов (длина от 9 до 22 аминокислотных остатков) ЛП; 2) создание обучающей библиотеки пептидов, активных против MRSA; 3) обучение нейронной сети распознаванию активных пептидов на основе обучающей выборки; 4) проверка предсказаний путем химического синтеза выбранных пептидов и оценки их антимикробной активности; 5) исследование физико-химических свойств активных пептидов.

Для обучения выбраны две нейросети, допускающие работу с данными пользователя: AMPlify [2], UniDL4BioPep [3]. Обучение этих моделей на наборе из 412 пептидов обучающей библиотеки позволило предсказать анти-MRSA-активность среди всего массива линейных пептидных фрагментов, включающего 75 235 пептидов. Для проверки предсказания выбрано 10 пептидов, которые были синтезированы твердофазным методом, далее для них была определена активность против штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Три пептида из этого набора показали активность с минимальной ингибирующей концентрацией (MIC) не выше 6,25 мкг/мл (рис. 1).

Из десяти отобранных пептидов два пептида (фрагменты Lycosin6k и 5c) оказались нерастворимы в воде, поэтому для структурно-функционального анализа был выбран водорастворимый Lycosin9i (см. рис. 1). Пептид был изучен в водном растворе, анионных мицеллах лизопальмитоилфосфатидилглицерина (LPPG), а также изучено его взаимодействие с нейтральными (DOPC, диолеоил-фосфатидил-фосфатидилхолин) и анионными (DOPG, диолеоил-фосфатидил-глицерин) липосомами. Структура Lycosin9i в воде является неупорядоченной, но в мицеллах представлена С-концевой α-спиралью (остатки 9-12). N-конец формирует нестандартную спираль. Благодаря наличию

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00160).
© П. А. Миронов, П. В. Дубовский, А. А. Баранова, В. А. Алферова, З. О. Шенкарев, 2025

```
LyeTx-I          --IWLTALKFLGKNLGKH-LAK-QQLAKL
LyeTx-Ib         --IWLTALKFLGKNLGK--LAK-QQLAKL
Lycosin9i        --IWLSLMKFAGKHLAKHQLSK---MG--
Lycosin-I      RK-GWFKAMKSIAKFIAKEKL-K-EHL---
Lycosin-II       --VWLSALKFIGKHLAKHQLSK---L---
Lycosin6k        K-FWFKALKSVAKFIAKQKLKQ-H-LGS-
Lycosin5c        -IIWLPVLKFLASHVA---MEQLSKLG--
```

Рис. 1. Токсины из яда паука *Lycosa singorensis*, обнаруживающие гомологию с идентифицированными нейросетью пептидами (*показаны красным цветом*), обладающими активностью в отношении MRSA. Выравнивание последовательностей выполнено вручную. Названия токсинов приведены *слева*

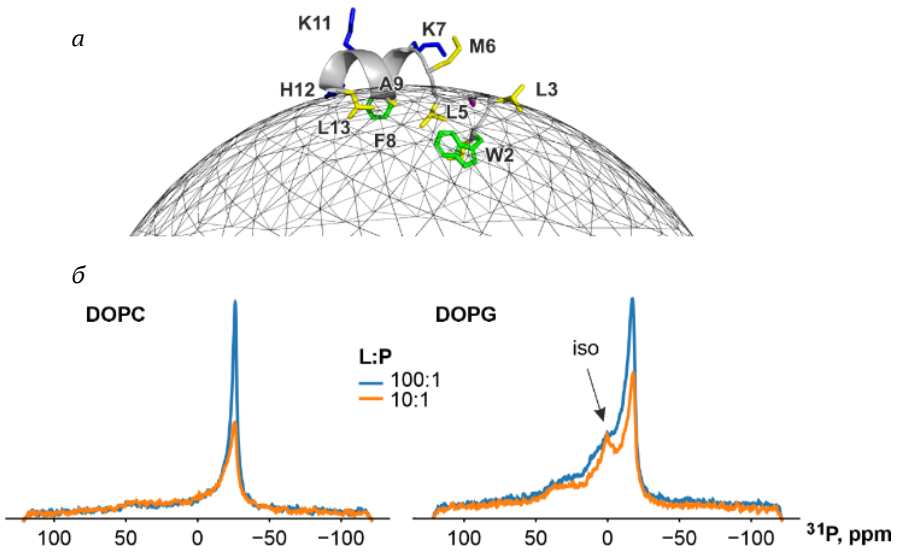


Рис. 2. Структура и мембранная активность Lycosin9i по данным ЯМР: *а* — локализация Lycosin9i на мицелле LPPG. Гидрофобные и полярные остатки окрашены желтым и синим цветом соответственно. Поверхность мицеллы показана сферой радиусом 37 Å; *б* — 31P-ЯМР-спектры липосом DOPC (*слева*) и DOPG (*справа*) при добавлении пептида до соотношения липид/пептид (L : P) 100 : 1 (*синий*) и 10 : 1 (*оранжевый*). Дестабилизация липосом DOPG проявляется появлением изотропного сигнала (iso, показан *стрелкой*) при L : P 10 : 1

NOE-контактов (NOE — ядерный эффект Оверхаузера) между молекулой пептида и LPPG, а также экспериментам с парамагнитным зондом установлено, что С-концевая спираль Lycosin9i располагается на поверхности мицеллы, а N-концевая спираль проникает внутрь, формируя гидрофобный якорь (рис. 2, *а*). Пептид демонстрирует мембранную активность в отношении липосом DOPG, однако не проявил активности в отношении липосом DOPC, что коррелирует с его селективностью в отношении грамположительных бактерий, плазматическая мембрана которых богата фосфатидилглицеринами (рис. 2, *б*).

Литература

1. Dubovskii P.V., Vassilevski A.A., Kozlov S.A. et al. Latarcins: versatile spider venom peptides // Cell Mol. Life Sci. 2015. Vol. 72, No. 23. P. 4501–4522.

2. Li C., Sutherland D., Hammond S.A. et al. AMPlify: attentive deep learning model for discovery of novel antimicrobial peptides effective against WHO priority pathogens // BMC Genomics. 2022. Vol. 23, No. 1. P. 77.

3. Du Z., Ding X., Xu Y., Li Y. UniDL4BioPep: a universal deep learning architecture for binary classification in peptide bioactivity // Brief Bioinform. 2023. Vol. 24, No. 3. P. bbad135.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-172

БИМОДАЛЬНЫЕ КОНТРАСТНЫЕ АГЕНТЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ *

BIMODAL CONTRAST AGENTS BASED ON HUMAN SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES FOR MAGNETIC RESONANCE AND FLUORESCENCE TOMOGRAPHY

Д. Е. Митин[1,2], И. А. Кирилюк[2], С. А. Добрынин[2], Е. В. Дмитриенко[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

D. E. Mitin[1,2], I. A. Kirilyuk[2], S. A. Dobrynin[2], E. V. Dmitrienko[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉ d.mitin@g.nsu.ru

Аннотация

Наночастицы сывороточного альбумина человека (НЧ ЧСА) являются перспективной биосовместимой платформой для селективной доставки. В работе получены бимодальные контрастные агенты (КА) на основе НЧ ЧСА, совмещающие стабильные нитроксильные радикалы (НИТ) и флуоресцентный краситель для магнитно-резонансной томографии (МРТ) и флуоресцентной томографии (ФТ).

Abstract

Human serum albumin nanoparticles (NP HSA) are a promising biocompatible platform for targeted delivery. In this work, bimodal contrast agents (CAs) based on HSA NPs were obtained, combining stable nitroxides (NIT) and a fluorescent dye for magnetic resonance imaging (MRI) and fluorescence tomography (FT).

Применение комбинированных подходов к визуализации опухолей позволяет преодолеть ограничения отдельных методов томографий. Перспективным является тандем МРТ и ФТ, позволяющий осуществить диагностику на всех этапах лечения онкологических заболеваний. МРТ является одним из наиболее информативных методов диагностики благодаря высокому пространственному разрешению и неограниченной глубиной проникновения в ткани. Однако низкий контраст между опухолевой и здоровой тканью часто требует применения контрастных агентов. Перспективной альтернативой широко распространенным в медицинской практике КА парамагнитным комплексам металлов, которые являются токсичными для организма, выступают биосовместимые стабильные НИТ [1]. Для направленной доставки КА в опухолевую ткань предложено использовать НЧ на основе ЧСА, сочетающие высокую биосовместимость, возможность эффективной инкапсуляции КА и простоту масштабирования синтеза.

Целью настоящего исследования стала разработка бимодальных НЧ ЧСА, содержащих нитроксильные радикалы и флуоресцентные красители, для одновременной визуализации опухолей методами МРТ и ФТ.

Для получения НЧ ЧСА был применен метод десольватации, заключающийся в контролируемом добавлении десольватирующего агента, с последующей стабилизацией структуры сшивающим агентом. В ходе исследования были оптимизированы параметры синтеза, что позволило получить монодисперсные НЧ ЧСА с контролируемым размером до 200 нм. Разработаны варианты присоединения функциональных молекул (цианиновых красителей и нитроксидов) к НЧ ЧСА путем ковалентной модификации. Предложены различные подходы к синтезу модифицированных НЧ ЧСА, основанные на предварительной ковалентной модификации ЧСА с последующим получением НЧ и на функционализации поверхности предварительно сформированных НЧ ЧСА. Для НЧ ЧСА с флуоресцентными красителями показано уменьшения относительного квантового выхода флуоресценции при увеличении степени мечения. Для подтверждения возможности применения НЧ в качестве КА для МРТ были рассчитаны значения релаксивностей r_1 и r_2. Причем значение r_2/r_1 для данных НЧ превышает в 5 раз хелатный комплекс Gd^{3+} Гадовист, что свидетельствует о перспективности их применения при регистрации T_2-взвешенных

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-13-00178), в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (проект № 125012300656-5).

© Д. Е. Митин, И. А. Кирилюк, С. А. Добрынин, Е. В. Дмитриенко, 2025

МРТ-изображений. Показана низкая цитотоксичность полученных НЧ на уровне нативного белка с помощью МТТ-теста. С использованием конфокальной микроскопии продемонстрировано внутриклеточное накопление флуоресцентно модифицированных НЧ ЧСА.

Литература

1. Mitin D., Bullinger F., Dobrynin, S. et al. Contrast Agents Based on Human Serum Albumin and Nitroxides for 1 H-MRI and Overhauser-Enhanced MRI // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25. P. 4041.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-173

СУБСТРАТНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОРАМИДНЫХ АЗОЛЬНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ *

SUBSTRATE AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF PHOSPHORAMIDATE AZOLE OLIGONUCLEOTIDES

Ф. В. Морозова, В. М. Голышев, А. А. Ломзов

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

F. V. Morozova, V. M. Golyshev, A. A. Lomzov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ fainamorozova@bk.ru

Аннотация

Для повышения специфичности и чувствительности методов ПЦР-анализа в составе праймеров вводят различные типы модификаций. Одним из перспективных аналогов НК для этого являются фосфорамидные азольные олигонуклеотиды (ФАО). В работе исследованы физико-химические и субстратные по отношению к Taq-полимеразе свойства комплексов ДНК с ФАО для совершенных и несовершенных комплексов (имеющих мисматч).

Abstract

To enhance the specificity and sensitivity of PCR assays, various types of nucleic acid (NA) modifications are commonly introduced into primer design. One promising class of NA analogs for this purpose is phosphoramidate azole oligonucleotides (PAOs) In this work, we investigated the physicochemical properties and substrate compatibility with Taq polymerases of DNA/PAO complexes, fully complementary and containing single-nucleotide mismatches.

ФАО — новый класс (PN)-замещенных олигонуклеотидных производных, содержащих замещенные азольные (имидазольные, оксазольные и тиазольные) фосфорамидные группы. Такие модификации могут быть введены в структуру олигонуклеотида в рамках автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза. На данный момент уже получены первые сведения о физико-химических свойствах ФАО [1, 2] и возможности их применения в качестве праймеров в ПЦР [3].

В работе были исследованы физико-химические свойства комплексов ДНК с ФАО (N-бензимида(окса,тиа)зольные) не только для комплементарных комплексов, но и тех, в которых присутствуют одиночные нуклеотидные несоответствия (мисматчи). Вместе с тем изучена эффективность элонгации модифицированных праймеров Taq-ДНК-полимеразой. Была исследована скорость и эффективность элонгации тринадцатизвенных ФАО-праймеров в комплексе с двадцатидвузвенной ДНК-матрицей как для систем с одиночными нуклеотидными несоответствиями, так и комплементарные комплексы при процессировании их ДНК-зависимой ДНК-полимеразой. Анализ продуктов удлинения ФАО-праймеров Taq-ДНК-полимеразой позволил определить важные для действия фермента положения ФА-групп в праймере, замедляющие или препятствующие удлинению олигомера.

Полученные данные показывают, что среди трех типов модификаций праймеры с N-бензоксазольной модификацией могут значимо ингибировать удлинение для несовершенных комплексов и обладают практически одинаковой с нативными праймерами эффективностью элонгации праймера до полноразмерного продукта и показывают себя как наиболее перспективный тип ФАО-модификации для их применения в ПЦР-анализе в составе праймеров.

Литература

1. Golyshev V. M., Yushin I. I., Gulyaeva O. A. et al. Properties of phosphoramide benzoazole oligonucleotides (PABAOs). I. Structure and hybridization efficiency of N-benzimidazole derivatives // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2024. Vol. 693. P. 149390.

2. Yushin I. I., Golyshev V. M., Novgorodtseva A. I. et al. Properties of phosphoramide benzoazole oligonucleotides (PABAOs). II. Structure and hybridization efficiency of N-benzoxazole derivatives // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2024. Vol. 740. P. 150997.

3. Chubarov A. S., Baranovskaya E. E., Oscorbin I. P. et al. Phosphoramidate Azole Oligonucleotides for Single Nucleotide Polymorphism Detection by PCR // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, No. 1. P. 617.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-74-01116).

© Ф. В. Морозова, В. М. Голышев, А. А. Ломзов, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-174

РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ ОЦИФРОВКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЛН ВОЗБУЖДЕНИЯ В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ПО ЗАПИСЯМ ОПТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ-АНТИАРИТМИКОВ *

DEVELOPMENT OF A TOOL FOR DIGITIZING THE PROPAGATION OF EXCITATION WAVES IN CARDIAC TISSUE FROM OPTICAL MAPPING RECORDINGS AND PREDICTING THE EFFECTS OF ANTIARRHYTHMIC DRUGS

Л. Э. Руппель[1], А. П. Синицына[1], В. А. Цвелая[1,2], К. И. Агладзе[1,2]

[1] *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*
[2] *Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*

L. E. Ruppel[1], A. P. Sinitsyna[1], V. A. Tsvelaya[1,2], K. I. Agladze[1,2]

[1] *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny*
[2] *Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*

✉ ruppel.LEH@phystech.edu

Аннотация

Антиаритмики используются для терапии желудочковой тахикардии — одного из наиболее опасных сердечно-сосудистых заболеваний. Существует множество препаратов, различных по механизму воздействия, а клиническая картина зависит от конкретного пациента. Создание инструмента прогнозирования воздействия антиаритмиков позволит сократить риски и издержки при подборе комбинации лекарств для терапии.

Abstract

Antiarrhythmic drugs are used to treat atrial fibrillation, one of the most lethal cardiovascular diseases. There are many drugs with different mechanisms of action. Moreover, the clinical picture varies from patient to patient. The development of a tool for predicting the effects of antiarrhythmic drugs will help reduce risks and costs when selecting drug combinations for therapy.

Сердечно-сосудистые заболевания представляют высокую угрозу для взрослого трудоспособного населения в развитых странах. Желудочковая тахикардия — одно из наиболее опасных их проявлений. Препараты-антиаритмики используются в медикаментозной терапии этой болезни. Клинические испытания, проводимые для препаратов-антиаритмиков в отдельности, трудно провести для всевозможных комбинаций антиаритмиков из-за времязатрат и количества средств, требуемых для этой задачи [1]. Помимо того, от физиологических особенностей конкретного пациента может меняться воздействие препаратов, вплоть до возникновения нежелательных побочных эффектов [2]. Поэтому при медикаментозной терапии желудочковой тахикардии требуется инструмент, позволяющий оценить или точно предсказать поведение сердечной ткани при одновременном воздействии нескольких антиаритмиков.

В настоящей работе мы предлагаем *in silico* решение, не требующее множественных данных оптического картирования для обучения предиктивной модели и основанное на построении модели ткани и применению к ней аналитических алгоритмов [3, 4]. При валидации алгоритмов прогноз соотносится с экспериментальными данными, полученными при оптическом картировании сердечной ткани, полученной из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Для характеризации пространственного распределения функциональных неоднородностей каждого образца строились амплитудные карты, которые совмещались с данными о зависимости скорости проведения от доли проводящих клеток. Определялся оптимальный порог соотношения проводящих и непроводящих клеток и шага модельной сетки для увеличения эффективности работы алгоритмов при сохранении точности переноса реальной ткани на смоделированную в терминах совпадения фронтов возбуждаемых волн во времени и пространстве.

Вариация параметров смоделированной ткани позволяет добиться визуального совпадения фронта волны возбуждения. Сравнение картин распространения волн при различном возбуждении ткани и фиксированных параметрах позволяет подтвердить корректность аппроксимации реальной ткани смоделированной.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (FSMG-2023-0015, соглашение № 075-03-2025-662 от 17 января 2025 г.)

© Л. Э. Руппель, А. П. Синицына, В. А. Цвелая, К. И. Агладзе, 2025

Литература

1. Reiffel J., Robinson V., Kowey P. Perspective on Antiarrhythmic Drug Combinations // Am. J. Cardiol. 2023. Vol. 192. P. 116–123.

2. Do U. Adverse reactions to antiarrhythmic drugs // Cardiovasc. Prev. Pharmacother. 2023. Vol. 5 (1). P. 1–14.

3. Sinitsyna A., Berezhnoy A., Semidetnov I. et al. Advanced Cardiovascular Toxicity Screening: Integrating Human iPSC-Derived Cardiomyocytes with 2D In Silico Models // Cardiovascular Toxicology. 2025. Vol. 25. P. 790–804.

4. Naumov V., Sinitsyna A., Semidetnov I. et al. Self-organization of conducting pathways explains complex wave trajectories in procedurally interpolated fibrotic cardiac tissue: A virtual replica study // Chaos: Interdisciplinary J. Nonlinear Sci. 2025. Vol. 35 (3).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-175

ЦВЕТОВЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ ИНФУЗОРИЙ *PARAMECIUM CAUDATUM*

COLOR PREFERENCES OF *PARAMECIUM CAUDATUM* INFUSORIA

М. А. Савицкий[1], А. В. Кузнецов[2,3]

[1]*Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва*
[2]*Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь*
[3]*Севастопольский государственный университет*

M. A. Savitskiy[1], A. V. Kusnetsov[2,3]

[1]*Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy*
[2]*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol*
[3]*Sevastopol State University*

✉ maxxsav37@gmail.com

Аннотация

Было проведено несколько серий экспериментов по выявлению цветовых предпочтений инфузорий вида *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1834. Исследовали воздействие лазеров трех длин волн (RGB) на группу инфузорий, находящихся в ограниченном пространстве стеклянного капилляра. Результаты свидетельствуют о спектральной зависимости фототаксиса: отрицательная реакция на синий свет и положительная на зеленый, что указывает на наличие специализированных фоторецепторов.

Abstract

A series of experiments were conducted to determine color preferences in the ciliate species *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1834. The study involved exposing a group of ciliates confined in a glass capillary to laser light at three different wavelengths (RGB). The results demonstrate a spectral dependence in phototaxis: a negative response to blue light and a positive response to green light, suggesting the presence of specialized photoreceptors.

Молекулярные механизмы восприятия светового раздражения отличаются в деталях у представителей различных царств живого. В целом от простейших до хордовых в этом процессе задействованы опсины — трансмембранные белки с 7 α-спиралями и молекулой ретиналя внутри, специфичные к определенным длинам световых волн. Эволюция опсиновых систем сопровождалась их усложнением и специализацией, коррелирующей с экологической нишей организма и типом питания. Например, у *Halobacterium salinarum* бактериородопсин участвует в бескислородном фотосинтезе, генерируя электрохимический градиент для синтеза АТФ [1]. У одноклеточных водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* пара родопсинов (A и B), связанных с кальциевыми каналами, регулируют фототаксис в зависимости от интенсивности света [2]. У миксотрофной *Euglena gracilis* родопсиноподобные белки образуют высокоупорядоченную структуру внутри мембраны двигательного жгутика, оптимизирующую поглощение света. Фототрансдукция инициируется изомеризацией этих белков, переходящих из состояния A498 в состояние B462 [3]. Особый интерес представляет фоторецепторная система *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1834 в силу того, что наличие родопсинподобных белков у представителей рода *Paramecium* доказано [4]. Ключевым этапом в понимании функционирования цветовосприятия у простейших является определение зависимости характера фототаксиса от длины световой волны.

Исходную культуру *P. caudatum* приобрели у коммерческого поставщика (https://7ants.ru/), на основе которой в лабораторных условиях были созданы экспериментальные популяции. Плотность инфузорий в отдельных пробах варьировала в пределах естественной изменчивости культуры. Исследование фототаксиса проводили в стеклянном капилляре с диаметром канала 3 мм. В капилляр набирали столб воды длиной 4–5 см, содержащий инфузории, после чего его размещали горизонтально. В качестве источников монохроматического света использовали три лазера мощностью по 1 Вт: красный (650 ± 10 нм), зеленый (532 ± 10 нм) и синий (450 нм). Эксперименты включали два типа воздействия: 1) одиночное лазерное облучение — луч направляли перпендикулярно капилляру в заданную точку; 2) парное лазерное облучение — фокусы двух лазеров располагали на расстоянии 1 см друг от друга.

© М. А. Савицкий, А. В. Кузнецов, 2025

Наблюдение за поведением инфузорий проводили с помощью микроскопа Микромед МС-4 LED с видеокамерой, подключенной к компьютеру. Фокус микроскопа фиксировали на расстоянии 0,5 см от точки воздействия лазера или на равном расстоянии от фокусов двух лазеров при парном воздействии. Для каждого эксперимента регистрировали два последовательных видеофрагмента: 1) фоновую активность (контрольный образец, лазеры выключены) и 2) реакцию на источник света (после включения лазера/лазеров).

Анализ видеозаписей длительностью по 1 мин выполняли с помощью оригинального алгоритма, реализованного на Python. Программа детектировала количество подвижных инфузорий и направление их движения (влево/вправо вдоль оси капилляра).

В случае одиночного воздействия направление движения интерпретировали как положительный или отрицательный фототаксис. При парном облучении анализировали предпочтение одного из двух источников света.

Доля инфузорий (в %), движущихся от цвета в столбце к цвету в строке ячейки

Цвет	W	R	G	B
W		53,39 ± 6,07	48,96 ± 5,00	62,42 ± 8,99
		+3,52 ± 9,93	−5,72 ± 8,05	+15,07 ± 8,96
R	43,61 ± 6,65		48,39 ± 5,47	51,87 ± 3,84
	−3,52 ± 9,93		+3,02 ± 10,77	+3,61 ± 4,63
G	51,98 ± 5,32	50,11 ± 5,47		52,45 ± 10,51
	+5,72 ± 8,05	−3,02 ± 10,77		+6,66 ± 10,17
B	36,56 ± 8,99	47,47 ± 3,84	46,89 ± 10,51	
	−15,07 ± 8,96	−3,61 ± 4,63	−6,66 ± 10,17	

Примечание. Нижние строки в каждой ячейке показывают изменение доли по сравнению с контролем.

Из экспериментов (см. таблицу) следует, что отрицательный фототаксис наиболее выражен при синем свете (−15,07 ± 8,96 %), тогда как зеленый свет вызывал положительную реакцию (+5,72 ± 8,05 %). В парных стимуляциях инфузории избегали синий свет в любых сочетаниях цветов, а также предпочитали красный зеленому. В целом цветовые предпочтения *P. caudatum* можно выразить как R > G >> B. Полученные результаты подтверждают способность инфузорий к спектральной дискриминации, указывают на наличие у них двух типов фоторецепторов и могут отражать адаптивные механизмы, логически связывающие синий спектр с УФ-опасностью, а зеленый — с фотосинтетически активными зонами, где располагается добыча.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что *P. caudatum* Ehrenberg, 1834 проявляет спектрально-зависимый фототаксис, и свидетельствуют о наличии у инфузории сложной системы цветовосприятия, что при дальнейшем изучении может дополнить общую картину эволюционных механизмов формирования зрительных систем у простейших и эукариот в целом.

Литература

1. Ernst O. P., Lodowski D. T., Elstner M. et al. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms // Nat. Rev. Microbiol. 2014. Vol. 114, No. 1. P. 126–163.

2. Sineshchekov O. A., Jung K.-H., Spudich J. L. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in Chlamydomonas reinhardtii // Proc. Nat. Acad. Sci. 2002. Vol. 99, No. 13. P. 8689–8694.

3. Barsanti L., Evangelista V., Passarelli V. et al. Fundamental questions and concepts about photoreception and the case of Euglena gracilis // Integr. Biol. 2012. Vol. 4. P. 22–36.

4. Nakaoka Y., Tokioka R., Shinozawa T. et al. Photoreception of Paramecium cilia: localization of photosensitivity and binding with anti-frog-rhodopsin IgG // J. Cell Sci. 1991. Vol. 99. P. 67–72.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-176

ВЗАИМОСВЯЗЬ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ КОРОВ С БИОХИМИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ И СЛЮНЫ *

THE RELATIONSHIP OF DAIRY PRODUCTS OF COWS WITH BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD SERUM AND SALIVA

М. Р. К. Сальседо[1], Л. В. Степанова[1], О. А. Коленчукова[2]

[1] *Сибирский федеральный университет, Красноярск*
[2] *Красноярский государственный аграрный университет*

M. R. K. Salcedo[1], L. V. Stepanova[1], O. A. Kolenchukova[2]

[1] *Siberian Federal University, Krasnoyarsk*
[2] *Krasnoyarsk State Agrarian University*

✉ slyudmila@mail.ru

Аннотация

Для выявления зависимости величины молочной продуктивности от метаболитов сыворотки крови и слюны исследованы коровы черно-пестрой породы ООО «ОПХ Солянское». Показано, что кровы с большим объемом дойности имели повышенный показатель альфа-амилазы в слюне или крови, что может быть обусловлено периодом лактации или «технологического» стрессового состояния коров из-за машинного доения.

Abstract

To identify the dependence of the value of milk productivity on blood serum and saliva metabolites, cows of the black-and-white breed of experimental production facilities “Solyanskoye” were studied. It was shown that cows with a large volume of milking had an increased alpha-amylase index in saliva or blood, which may be due to the lactation period or the “technological” stress state of cows due to machine milking.

Введение

Молочная продуктивность обусловлена согласованной напряженной работой всего организма коровы. Утверждается, что все компоненты молока образуются из крови, которая поступает в молочную железу, поэтому по биохимическим показателям крови можно судить об интенсивности обменных процессов и уровне молочной продуктивности животных.

Существует также взаимосвязь между количеством слюны и объемом надоя молока: чем больше слюны синтезируется в организме коровы, тем больше она дает молока, что связано с тем, что слюна облегчает усвоение белка из растительных кормов.

Многие авторы предлагают использовать метаболиты крови и состав слюны в качестве дополнительных тестов в селекции, направленной на повышение молочной продуктивности крупного рогатого скота, путем выявления и последующего разведения животных, метаболический уровень которых свойственен коровам с высокими показателями молочной продуктивности [1]. Поэтому исследования связи между показателями молочной продуктивности и биохимическими показателями крови и слюны является актуальным и имеет научную новизну в селекционной работе племрепродукторов для повышения молочной продуктивности коров.

Целью работы явилось выявление зависимости метаболитов сыворотки крови и слюны от величины молочной продуктивности коров.

Материалы и методы

Исследования проводили на коровах (n = 40), которых разводили в племенной организации ООО «ОПХ Солянское» Красноярского края. Кровь и слюну для исследований брали в стойловый период у здоровых дойных коров черно-пестрой породы, разных по возрасту, продуктивности и стадии лактации. Забор крови проводили из яремной вены общепринятым способом в одноразовые пробирки с коагулянтом после вечернего доения. Слюну собирали в ротовой полости в стерильные пробирки объемом 2 мл.

* Исследования выполнены в ходе тематического плана-задания по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации по теме «Разработка порядка диагностики состояния микробиоты и мер по сохранению или восстановлению нормальной микробиоты сельскохозяйственных животных».

© М. Р. К. Сальседо, Л. В. Степанова, О. А. Коленчукова, 2025

Коровы были разделены на две группы по уровню молочной продуктивности. В сыворотке и слюне определяли содержание альфа-амилазы, молочной кислоты и щелочной фосфатазы, концентрации ионов натрия, калия и магния. Использованы стандартные наборы реагентов фирмы ООО «Ольвекс диагностикум» (Санкт-Петербург).

Использован спектрофотометрический анализ растворов окрашенных соединений. Регистрировали оптическую плотность растворов на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Статистическую обработку данных осуществляли в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с применением непараметрического критерия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Показано, что коровы 2-й группы дойности от 1-й достоверно отличались повышенным количеством дойных дней ($p = 0,00005$) и объемом суточного удоя ($p = 0,008$), а также повышенной концентрацией альфа-амилазы в слюне ($p = 0,01$), которая значительно выше нормы.

Корреляционный анализ показал, что повышенное содержание альфа-амилазы в слюне коров 2-й группы коррелировало с низкой концентрацией ионов натрия ($r = -0,5$, $p = 0,05$) и пониженным содержанием щелочной фосфатазы в крови ($r = 0,5$, $p = 0,05$) относительно нормы [2]. Такие показатели могут указывать на период лактации коров или «технологическое» стрессовое состояние коров, предположительно из-за частого машинного доения [2].

Анализ показателей коров по суточной дойности выявил также две группы, отличающиеся друг от друга суточным удоем ($p = 0,02$) и концентрацией щелочной фосфатазы в крови ($p = 0,00005$). При этом в группе с повышенным суточным удоем наблюдалось понижение концентрации щелочной фосфатазы в крови.

Корреляционный анализ показал, что пониженная концентрация щелочной фосфатазы обратно коррелировала с возрастом ($r = -0,6$, $p = 0,05$) и номером текущей лактации ($r = -0,6$, $p = 0,05$), а также с повышением концентрации альфа-амидазы в крови ($r = 0,7$, $p = 0,05$), что может быть показателем стрессового состояния коровы.

Заключение

Коровы с большим объемом дойности имели повышенный показатель альфа-амилазы в слюне или крови, что может быть обусловлено периодом лактации или «технологического» стрессового состояния коров из-за машинного доения. Необходимы дальнейшие исследования для выявления причин, обуславливающие отклонение показателей сыворотки крови и слюны от нормы.

Литература

1. Жариков Я. А., Канева Л. А. Взаимосвязь суточного удоя и биохимического статуса сыворотки крови коров // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2014. Т. 2, № 39. С. 51–55.

2. Трубников Д. В. Технологический стресс как фактор снижения молочной продуктивности и воспроизводительной функции коров // Вестн. Кур. гос. с/х акад. 2015. № 1. С. 69–71.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-177

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ МОЛЕКУЛ NADH В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ОБОБЩЕНИЯ МЕТОДА ED-FRAP И ДЕТЕКЦИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ *

STUDY OF THE PHOTOBLEACHING DYNAMICS OF NADH MOLECULES IN CARDIAC TISSUE FOR GENERALIZATION OF THE ED-FRAP METHOD AND DETECTION OF ISCHEMIC DAMAGE

М. М. Слотвицкий[1–3], М. С. Медведев[1,2], Г. С. Пашинцев[1,2], В. А. Грязнов[2], В. С. Качан[1,2], К. И. Агладзе[2,3], В. А. Цвелая[1–3]

[1] Университет ИТМО, Санкт-Петербург
[2] Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный
[3] Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

M. M. Slotvitsky[1–3], M. S. Medvedev[1,2], G. S. Pashintsev[1,2], V. A. Gryaznov[2], V. S. Kachan[1,2], K. I. Agladze[2,3], V. A. Tsvelaya[1–3]

[1] ITMO University, Saint Petersburg
[2] Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny
[3] Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute

✉ slotvitsky.mm@gmail.com

Аннотация

В настоящей работе мы показываем, что оптической метод ED-FRAP (*enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching*) может быть использован для неинвазивной детекции очагов ишемии сердечной ткани. В экспериментах на клеточных моделях мы показали, что анализ флуоресценции NADH методом ED-FRAP позволяет спрогнозировать влияние ишемии на скорость проведения возбуждения по сердечной ткани.

Abstract

In this paper, we demonstrate that the optical method ED-FRAP (enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching) can be used for noninvasive detection of ischemic foci in cardiac tissue. In experiments on cell models, we showed that NADH fluorescence analysis by the ED-FRAP method allows us to predict the effect of ischemia on the excitation conduction velocity in cardiac tissue.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) — причина ~ 50 % смертей в развитых странах [1]. Трансплантация сердца остается ключевым методом лечения терминальных стадий, но ее применение ограничено дефицитом донорских органов. Около 60 % сердец признаются непригодными к пересадке, в том числе из-за ишемических повреждений (тепловая и холодовая ишемия), что повышает риск послеоперационных осложнений [1, 2]. Наибольшей перспективой для изучения функциональности сердечной ткани обладают оптические методы, такие как оптическое картирование волны возбуждение, однако они не применимы при кардиоплегической остановке сердца. Чтобы восполнить имеющийся пробел и дополнить методы оптического картирования сердца вариацией для оценки метаболического состояния, мы исследовали метод фермент-зависимого восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания для молекул NADH (ED-FRAP, *enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching*) [3–6]. Сложность применения данного метода сводится к неоднозначности интерпретации сигнала ED-FRAP: основным источником информации является фаза восстановления флуоресценции, однако она может зависеть не только от активности ферментов, восстанавливающих NAD^+ до NADH (преимущественно глутамат-дегидрогеназы, GDH), но и от локальных свойств поглощения и отражения возбуждающего излучения (ближний ультрафиолет, 365 нм) поверхностью ткани, снижающих эффективность предварительного фотообесцвечивания [3].

В настоящей работе мы провели математическое описание процесса фотообесцвечивания NADH до NAD^+ и обратного восстановления под действием фермента GDH с учетом необратимых потерь молекул NADH. Это обобщение позволило модифицировать методику обработки экспериментальных записей таким образом, чтобы не зависеть от оптических свойств исследуемого образца — мы смогли свести к общей статистике эксперимен-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-21-00162).

© М. М. Слотвицкий, М. С. Медведев, Г. С. Пашинцев, В. А. Грязнов, В. С. Качан, К. И. Агладзе, В. А. Цвелая, 2025

тальные записи ED-FRAP из исследований [4–6], напрямую сравнив активность GDH в разных экспериментальных моделях сердечной ткани. Далее мы проверили гипотезу, что протокол ED-FRAP может быть сокращен с двух фаз (фотообесцвечивание и восстановление) до одной фазы с одновременным протеканием обоих процессов, что позволяет снизить общую экспозицию возбуждающего излучения на ткань. Такая модификация ED-FRAP позволила нам впервые из сходных исследований [4–6] оценить прогностическую способность анализа активности GDH: на монослоях желудочковых кардиомиоцитов человека, полученных дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, мы показали прямую корреляцию активности GDH и изменения скорости проведения волны возбуждения после длительной ишемии.

Литература

1. McCartney S. L., Patel C., Del Rio J. M. Long-term outcomes and management of the heart transplant recipient // Best Practice Res. Clin. Anaesthesiol. 2017. Vol. 31, No. 2. P. 237–248.

2. Beuth J. et al. New strategies to expand and optimize heart donor pool: ex vivo heart perfusion and donation after circulatory death: a review of current research and future trends // Anesthesia Analgesia. 2019. Vol. 128, No. 3. P. 406–413.

3. Tornmalm J. et al. Local redox conditions in cells imaged via non-fluorescent transient states of NAD (P) H // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, No. 1. P. 15070.

4. Moreno A. et al. Enzyme-dependent fluorescence recovery of NADH after photobleaching to assess dehydrogenase activity of isolated perfused hearts // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, No. 1. P. 45744.

5. Joubert F. et al. NADH enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP): applications to enzyme and mitochondrial reaction kinetics, in vitro // Biophys. J. 2004. Vol. 86, No. 1. P. 629–645.

6. Combs C. A., Balaban R. S. Direct imaging of dehydrogenase activity within living cells using enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP) // Biophys. J. 2001. Vol. 80, No. 4. P. 2018–2028.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-178

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФЕРМЕНТА ЦЕЛЛЮЛАЗЫ (*CEL*7465) МЕТОДАМИ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕИВАНИЯ*

ANALYSIS OF STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE ENZYME CELLULASE (CEL7465) BY SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING METHODS

Н. А. Смольянова[1,2], Н. С. Гараева[2], Э. Э. К. Агбоигба[3], Н. В. Трахтманн[3], Ш. З. Валидов[3], А. И. Иваньков[4], А. В. Рогачев[4], К. С. Усачев[2], С. В. Тощаков[2], М. В. Патрушев[2], И. Н. Лаврик[2], М. М. Юсупов[2], А. Д. Никулин[1]

[1]*Институт белка РАН, Пущино*
[2]*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*
[3]*Казанский научный центр РАН*
[4]*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*

N. A. Smolyanova[1,2], N. S. Garayeva[2], E. E. K. Agboigba[3], N. V. Trachtmann[3], Sh. Z. Validov[3], A. I. Ivankov[4], A. V. Rogachev[4], K. S. Usachev[2], S. V. Toshchakov[2], M. V. Patrushev[2], I. N. Lavrik[2], M. M. Yusupov[2], A. D. Nikulin[1]

[1]*Institute of Protein Research RAS, Pushchino*
[2]*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*
[3]*Kazan Scientific Center RAS*
[4]*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny*

✉ smolyanova_natulya@mail.ru

Аннотация

В современных биотехнологических процессах достижение экономической рентабельности во многом определяется использованием стабильных и высокоэффективных ферментов. Эти биокатализаторы играют ключевую роль в различных отраслях промышленности, обеспечивая эффективное проведение химических реакций в мягких условиях, что значительно снижает энергозатраты и минимизирует образование вредных побочных продуктов. Особенно важное значение ферментные препараты приобретают в пищевой индустрии и процессах переработки растительного сырья в ценные продукты, где они позволяют осуществлять сложные биохимические превращения с высокой специфичностью и селективностью. К таким относятся белки, разрушающие полисахариды растений, — пектиназы, целлюлазы, альфа-амилазы. В рамках этой работы была изучена новая, ранее не описанная целлюлаза cel7465 из термальной скважины Бирагзанг (Респ. Северная Осетия — Алания). Исследование метагеномного контига, содержащего данный ген, а также изучение аминокислотной последовательности *cel*7465 указывают на то, что данный фермент принадлежит некультивируемому микроорганизму из *Fimbriimonadales*.

Abstract

In modern biotechnological processes, the achievement of economic profitability is largely determined by the use of stable and highly effective enzymes. These biocatalysts play a key role in various industries, ensuring efficient chemical reactions under mild conditions, which significantly reduces energy consumption and minimizes the formation of harmful by-products. Enzyme preparations are particularly important in the food industry and in the processing of plant raw materials into valuable products, where they allow complex biochemical transformations with high specificity and selectivity. These include proteins that destroy plant polysaccharides — pectinases, cellulases, alpha-amylases. In the framework of this work, a new, previously undescribed cellulase cel7465 from the Biragzang thermal well (Rep. North Ossetia-Alania). The study of the metagenomic contigue containing this gene, as well as the study of the amino acid sequence *cel*7465, indicates that this enzyme belongs to an uncultivated microorganism from *Fimbriimonadales*.

Ген *cel*7465 был амплифицирован с метагеномной ДНК и клонирован в экспрессионный вектор pET28a. Целлюлаза 7465, полученная в результате экспрессии в клетках *Escherichia coli*, была обнаружена в растворимой форме. Процесс очистки полученного фермента осуществлялся в два этапа: сначала применялась металл-хелатная хроматография с использованием Ni-NTA сорбента, затем следовала эксклюзионная хроматография. *In vitro* тестирование на карбокси-метил целлюлозе продемонстрировало способность очищенной целлюлазы эффективно функционировать при высоких температурах в различных значениях pH. Исследование фермента Cel7465 включало анализ его структурных характеристик с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) что позволило определить форму и размеры белковой молекулы. Данные МУРР обрабатывали в пакете программ

* Исследование выполнено в рамках соглашения № 075-15-2025-012 о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии в целях реализации научного проекта под руководством привлекаемого ведущего ученого.

© Н. А. Смольянова, Н. С. Гараева, Э. Э. К. Агбоигба, Н. В. Трахтманн, Ш. З. Валидов, А. И. Иваньков, А. В. Рогачев, К. С. Усачев, С. В. Тощаков, М. В. Патрушев, И. Н. Лаврик, М. М. Юсупов, А. Д. Никулин, 2025

ATSAS. Полученная 3D-модель электронной плотности имеет глобулярную форму, радиус гирации составлял Rg = 21,65 Å. Сопоставление полученных экспериментальных данных с рассчитанной структурой Cel7465 в программном пакете AlphaFold3 (54 × 51 × 50 Å) указывает на наличие мономерной глобулярной формы белка в растворе. Разработанный протокол позволяет перейти к следующему этапу структурных исследований методом рентгеноструктурного анализа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-179

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕГО ПЕРСПЕКТИВА В АДДИТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ *

MECHANICAL PROPERTIES OF HYDROGEL BASED ON MODIFIED HYALURONIC ACID AND ITS PROSPECTS IN ADDITIVE TECHNOLOGIES

М. Ю. Сучков[1], В. И. Кузяева[2], А. В. Сочилина[2], Р. А. Акасов[2], Т. В. Егорова[1], А. Н. Генералова[2]

[1]*Московский педагогический государственный университет*
[2]*Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

M. Yu. Suchkov[1], V. I. Kuzyaeva[2], A. V. Sochilina[2], R. A. Akasov[2], T. V. Egorova[1], A. N. Generalova[2]

[1]*Moscow Pedagogical State University*
[2]*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

E-mail: max.suchkov 3001@yandex.ru

Аннотация

Гиалуроновая кислота представляют сегодня интерес для 3D-биопечати. В настоящей работе исследованы свойства гидрогелей на основе модифицированной гиалуроновой кислоты с кросс-линкером полиэтиленгликоль диакрилатом, включая его адгезию к соединительной ткани, кинетику деградации при физиологических условиях, а также механические характеристики, определяющие разработку биочернил в будущем.

Abstract

Hyaluronic acid is of interest today for 3D bioprinting. In this study, the properties of hydrogels based on modified hyaluronic acid with a polyethylene glycol diacrylate cross-linker were investigated, including their adhesion to connective tissue, degradation kinetics under physiological conditions, as well as mechanical characteristics that determine the future development of bioinks.

Гиалуроновая кислота (ГК) — это эндогенный полисахарид, состоящий из повторяющихся дисахаридных фрагментов N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты, который широко распространен в организме человека, особенно в соединительной ткани, коже и внеклеточном матриксе. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, включая ее растворимость и наличие реакционноспособных функциональных групп, и биологической активности ГК привлекает внимание как перспективный материал для регенеративной медицины [1]. Однако ее применение ограничено низкой механической прочностью и быстрой деградацией *in vivo*. Целью работы является изучение влияния степени модификации ГК и параметров кросс-линкера ПЭГДА на механические свойства и деградации гидрогелей, а также оценка их потенциального применения в тканевой инженерии.

Образцы, полученные модификацией ГК глицидилметакрилатом, для образования геля фотоотверждались *in situ*. В качестве фотоинициатора был выбран I тип фенил(2,4,6-триметилбензоил) фосфинат лития (LAP) из-за его водорастворимости, низкой токсичности, высокой скорости реакции и доступности на рынке. Активация LAP проводилась УФ-светодиодом с длиной волны 365 нм.

Испытания прочности на сжатие и сдвиговое напряжение при растяжении проводились на устройстве ElectroPuls E-1000 Dynamic Test System (Instron, США). Установлено, что образцы от 5 до 20 масс.% мГК обладают модулем Юнга от 0,90 ± 0,31 до 3,00 ± 0,25 МПа соответственно, что соотносится с показателями плотной соединительной ткани и эластичного хряща, которые находятся в диапазоне примерно 0,5–5 МПа [2]. При испытании на растяжение, проведенном на свиной коже, отмечено, что точка разрыва у образцов с 20 масс.% мГК находится на уровне 14,7 ± 0,3 мм при модуле сдвига 0,51 ± 0,2 МПа.

Кроме того, исследована кинетика деградации гидрогеля в физиологическом растворе, фетальной бычьей сыворотке и клеточной среде DMEM на модели костного дефекта свиной кости *in vitro*. Были представлены образцы с разной степенью замещения (СЗ) ГК винильными группами, а также с различной концентрацией и молекулярной массой кросс-линкера ПЭГДА. В течение 30-дневной инкубации в CO^2 с периодической заменой среды каждые 3 дня было отмечено, что гидрогели значительно набухают в среде DMEM (примерно в 2 раза), а образцы без кросс-линкера полностью деградировали в среде DMEM, что может указывать на поведение гидрогеля в условиях с клетками и температурой организма.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства просвещения РФ (№ 124031100005-5).
© М. Ю. Сучков, В. И. Кузяева, А. В. Сочилина, Р. А. Акасов, Т. В. Егорова, А. Н. Генералова, 2025

Таким образом, подобранные параметры фотокомпозиций, а именно степень замещения ГК винильными группами около 41,2 % с концентрацией 20 масс.%, концентрация ПЭГДА в диапазоне 5–10 масс.%, демонстрируют потенциал в формировании гидрогелей с механическими свойствами, соответствующими тканям-мишеням. Разработанные гидрогели обладают базовыми характеристиками, позволяющими рассматривать их как перспективные материал для создания тканеинженерных конструкций в условиях 3D-биопечати *in situ*.

Литература

1. Сучков М. Ю., Кузяева В. И., Сергеев И. С. и др. Модифицированные природные полимеры с биоактивными добавками для восстановления критического костного дефекта // Науч.-техн. ведомости СПбГПУ. Физ.-матем. науки. 2024. Т. 17, № 3.2. С. 306–310.

2. Kempson G. E., Freeman M. A. R., Swanson S. A. V. The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head // J. Biomech. 1971. Vol. 4, No. 4. P. 239–250.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-180

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕРАГЕРЦОВЫХ МЕТАМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ *

APPLICATION OF TERAHERTZ METAMATERIALS FOR STEROID HORMONE DETECTION

Д. С. Устьянцева[1,2], М. Р. Конникова[3,4], О. П. Черкасова[1,3], Н. А. Николаев[1,2]

[1] *Институт автоматики и электрометрии СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*
[3] *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*
[4] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

D. S. Ustyantseva[1,2], M. R. Konnikova[3,4], O. P. Cherkasova[1,3], N. A. Nikolaev[1,2]

[1] *Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*
[3] *National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*
[4] *Lomonosov Moscow State University*

✉ d.ustyantseva@g.nsu.ru

Аннотация

Исследованы терагерцовые метаматериалы для детектирования стероидных гормонов кортизола и кортизона. Дизайн элементарной ячейки имеет форму модифицированного расщепленного кольца. Изучены сдвиги резонансных частот и амплитуды пропускания сенсоров в зависимости от количества гормонов. Рассчитаны основные показатели эффективности ТГц-метаматериалов и определены наиболее перспективные для дальнейшего применения.

Abstract

Terahertz split-ring metamaterials for the detection of cortisol and cortisone are investigated. Shifts in resonance frequencies and transmittance as a function of the hormone quantity are studied. The main performance indicators of THz metamaterials are calculated and the most promising ones for further application are determined.

Терагерцовое (ТГц) излучение (0,1–10 ТГц) [1] представляет особый интерес для биомедицинских исследований, поскольку в этом диапазоне лежат характерные резонансные частоты вращательных и низкочастотных колебательных мод многих биологически важных молекул [2]. Методы ТГц-спектроскопии позволяют распознавать биомолекулы быстрым, высокочувствительным и неразрушающим способом [3]. Применение ТГц-метаматериалов делает возможным повышение чувствительности спектроскопии при анализе биологических образцов [4]. Цель работы состояла в разработке методики детектирования стероидных гормонов кортизола и кортизона с помощью ТГц-метаматериалов.

В работе изучали два типа метаматериалов на основе расщепленных кольцевых резонаторов (*split-ring resonators*, SRR): поляризационно-нечувствительный сенсор на основе массива золотых резонаторов на кварцевой подложке (резонансная частота 1,53 ТГц) и поляризационно-чувствительный сенсор с алюминиевым проводящим слоем на кремниевой подложке (резонансные частоты 0,66, 1,52 и 1,87 ТГц) [5].

Эксперименты проводили с использованием импульсного ТГц-спектрометра в диапазоне 0,1–2 ТГц [6]. Растворы гормонов (кортизол и кортизон) готовили в этиловом спирте с концентрацией 1 мкг/мкл. Растворы наносили на поверхность сенсоров по 3 мкл с последующим измерением спектров пропускания после полного испарения растворителя.

Результаты показали, что поляризационно-нечувствительный сенсор с золотым покрытием (1,53 ТГц) демонстрирует линейное уменьшение поглощения и линейное увеличение резонансной частоты в зависимости от количества кортизола. В случае поляризационно-чувствительного сенсора с покрытием из алюминия наблюдалась нелинейная зависимость поглощения от количества кортизола для частоты 1,52 ТГц, описываемая уравнением Хилла. Оба сенсора демонстрировали селективность к кортизолу, практически не реагируя на присутствие кортизона.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИАиЭ СО РАН (эксперимент), НИЦ «Курчатовский институт» (изготовление ТГц-метаматериалов) и МГУ им. М. В. Ломоносова (дизайн метаматериалов). В работе использовалось оборудование ЦКП «Спектроскопия и оптика» ИАиЭ СО РАН.

© Д. С. Устьянцева, М. Р. Конникова, О. П. Черкасова, Н. А. Николаев, 2025

Сравнение основных параметров сенсоров показало, что ТГц-метаматериал с золотым покрытием обладает более высокой чувствительностью и добротностью по сравнению с метаматериалом с алюминиевым проводящим слоем, что делает его более перспективным для практического применения. Дальнейшая работа будет направлена на оптимизацию дизайна метаматериала для повышения чувствительности сенсора к кортизолу и снижению предела обнаружения.

Литература

1. Царев М. В. Генерация и регистрация терагерцового излучения ультракороткими лазерными импульсами: учеб. пособие. Н. Новгород: Нижегород. гос. ун-т, 2011. С. 75.

2. Смирнова И. Н., Федулова Е. В., Назаров М. М., Черкасова О. П. Структурно-чувствительные изменения в спектрах терагерцового поглощения ряда кортикостероидных гормонов // Вестн. НГУ. 2010. Т. 5, № 4. С. 170–175.

3. Chen X., Lindley-Hatcher H., Stantchev R. I. et al. Terahertz (THz) biophotonics technology: Instrumentation, techniques, and biomedical applications // Chem. Phys. Rev. 2022. Vol. 3. Art. 011311.

4. Wang H., Zheng F., Xu Y. et al. Recent progress in terahertz biosensors based on artificial electromagnetic subwavelength structure // TrAC Trends Anal. Chem. 2023. Vol. 158. Art. 116888.

5. Синько А. С. и др. Мультиспектральный узкополосный источник терагерцевого излучения на основе молекулярного кристалла RbAP и перестраиваемого фильтра из метаматериала // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2024. № 12. С. 13–28.

6. Анцыгин В. Д., Мамрашев А. А., Николаев Н. А., Потатуркин О. И. Малогабаритный терагерцовый спектрометр с использованием второй гармоники фемтосекундного волоконного лазера // Автометрия. 2010. Т. 46, № 3. С. 110–117.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-181

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ТРОМБОЦИТАРНОЙ АГРЕГАЦИИ ПРИ БОЛЕЗНИ ВИЛЛЕБРАНДА: МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ КОМПЛЕКСА A1 VWF — GPIB*

MECHANISMS OF PLATELET AGGREGATION DISORDER IN VON WILLEBRAND DISEASE: MOLECULAR DYNAMICS MODELING OF THE A1 VWF — GPIB COMPLEX

И. В. Федотова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

I. V. Fedotova

Lomonosov Moscow State University

✉ fedotova.iv18@physics.msu.ru

Аннотация

Важное значение на начальных этапах остановки кровотечения в артериях и артериолах имеет взаимодействие рецептора тромбоцитов GPIb и домена A1 VWF. Точечные мутации в A1 VWF могут вызывать болезнь Виллебранда — наследственное нарушение агрегации тромбоцитов. Результаты моделирования молекулярной динамики взаимодействия A1 VWF и GPIb показывают, что такой эффект мутаций может обеспечиваться за счет их влияния на физические свойства этих макромолекул.

Abstract

The interaction of the platelet receptor GPIb and the A1 domain of VWF is important in the initial stages of stopping bleeding in arteries and arterioles. Point mutations in A1 VWF can cause von Willebrand disease, an inherited disorder of platelet aggregation. The results of molecular dynamics modeling of the A1 VWF and GPIb interaction show that such an effect of mutations can be provided by their influence on the physical properties of these macromolecules.

Повреждение стенки кровеносного сосуда инициирует процесс гемостаза, обеспечивающий остановку кровотечения путем адгезии тромбоцитов к субэндотелиальным структурам и формирования агрегата клеток. В артериях, венулах и артериолах — сосудах с высоким напряжением сдвига — для осуществления адгезии тромбоцитов необходимо вначале обеспечить снижение их скоростей. Важное значение на этом этапе гемостаза имеет гликопротеин плазмы крови фактор фон Виллебранда (VWF), циркулирующий в кровотоке в глобулярной мультимерной форме. В области ранения VWF присоединяется к субэндотелиальному коллагену и под действием гидродинамических сил разворачивается, открывая для взаимодействия с тромбоцитами домен A1 — лиганд альфа-субъединицы мембранного рецептора клеток гликопротеина Ib (GPIb). GPIb обратимо связывается с доменом A1 VWF посредством электростатических нековалентных взаимодействий, за счет чего тромбоциты осуществляют качение вдоль мультимера VWF, уменьшают свою скорость и останавливаются в области повреждения сосуда [1].

Было установлено, что под воздействием гидродинамических сил кровотока связь указанных белков дикого типа усиливается [2]. Такой адаптивный механизм позволяет избежать тромбообразования в здоровых сосудах и обеспечить адгезию тромбоцитов в патологических ситуациях. Однако наличие точечных мутаций в аминокислотной последовательности A1 VWF может нарушать реализацию этого механизма и приводить к наследственному нарушению агрегации тромбоцитов — болезни Виллебранда подтипов 2B и 2M, соответственно характеризующихся повышенной и пониженной агрегацией клеток. Исследование кинетики взаимодействия GPIb и A1 VWF дикого типа важно как для понимания принципа усиления адгезии тромбоцитов в условиях высоких сдвиговых напряжений, так и для уточнения теоретический представлений о механизмах клеточной адгезии в целом, а изучение влияния точечных мутаций A1VWF на динамику взаимодействия GPIb и A1VWF может способствовать разработке лекарственных средств против болезни Виллебранда.

В настоящей работе методами молекулярной динамики изучается взаимодействие GPIb и A1 VWF дикого типа, а также двух мутантных вариантов с аминокислотными заменами V1316M и F1369I, которые, согласно известным данным, приводят к болезни Виллебранда подтипов 2B и 2M соответственно [3, 4]. В программном пакете GROMACS с использованием силового поля CHARMM36 построена полноатомная молекулярная модель

* Исследование выполнено при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики «Базис» (проект № 24-2-10-4-1).

© И. В. Федотова, 2025

связанного комплекса GPIb и A1 VWF дикого типа и мутантных вариантов. С помощью методов управляемой молекулярной динамики был смоделирован процесс диссоциации комплекса GPIb и A1 VWF под воздействием внешней растягивающей силы, которая имитирует действующую на тромбоцит гидродинамическую силу кровотока. Параметры управляемой молекулярной динамики, а также ограничения позиции определенных участков белков в процессе моделирования подбирались в соответствии с физиологическими условиями: в кровотоке домен A1 закреплен в цепи мультимера VWF, а внешняя гидродинамическая сила воздействует на тромбоцит.

Был проведен ряд запусков моделирования молекулярной динамики для каждого комплекса белков. В ходе моделирования растяжения комплекса GPIb и A1 VWF выявлены этапы разрушения связи между макромолекулами, включающие конформационные изменения белков, в частности деформацию концевых линкеров A1 VWF, переключение сайтов связывания. Был проведен анализ солевых мостиков, задействованных в поддержании связи GPIb и A1 VWF на различных этапах моделирования, для белков дикого типа и мутантных вариантов. Получены силовые характеристики и потенциал средней силы для процессов диссоциации связи GPIb и A1 VWF дикого типа и мутаций V1316M и F1369I и проведен их сравнительный анализ.

Результаты иллюстрируют возможный механизм усиления агрегации тромбоцитов при наличии аминокислотных замен, вызывающих болезнь Виллебранда подтипа 2B. Этот механизм, предположительно, может позволять A1 VWF релаксировать к положению, обеспечивающему более прочное связывание с GPIb, за счет изменения физической жесткости глобулы белка.

Литература

1. Springer T.A. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream // Blood. 2014. Vol. 124 (9). P. 1412–1425.

2. Yago T., et al. Platelet glycoprotein Ibalpha forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF // J. Clin. Invest. 2008. Vol. 118 (9). P. 3195–3207.

3. Wohner N. et al. Shear stress-independent binding of von Willebrand factor-type 2B mutants p.R1306Q & p.V1316M to LRP1 explains their increased clearance // J. Thromb. Haemost. 2015. Vol. 13 (5). P. 815–20.

4. Tischer A. et al. Misfolding of vWF to pathologically disordered conformations impacts the severity of von Willebrand disease // Biophys. J. 2014. Vol. 107 (5). P. 1185–1195.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-182

ОПТИЧЕСКИЙ ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПОТИРЕОЗОМ И УЗЛОВЫМ НЕТОКСИЧЕСКИМ ЗОБОМ

OPTICAL PRINCIPLE OF STUDYING PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PATIENTS WITH HYPOTHYROIDISM AND NODULAR NONTOXIC GOITER

М. В. Чепис[1], Д. С. Сивкова[1], И. В. Ральченко[2]

[1] *Тюменский государственный медицинский университет*
[2] *Тюменский государственный университет*

M. V. Chepis[1], D. S. Sivkova[1], I. V. Ralchenko[2]

[1] *Tyumen State Medical University*
[2] *Tyumen State University*

✉ 89829174553@mail.ru

Аннотация

Нарушения в системе гемостаза у пациентов с заболеваниями щитовидной железы в случае отсутствия точных клинико-анамнестических данных обусловлены в большей степени патологией тромбоцитов. В настоящее время одним из методов оценки функциональной активности тромбоцитарного звена гемостаза в лабораторной практике является агрегатометрия.

Abstract

Disturbances in the hemostasis system in patients with thyroid diseases, in the absence of precise clinical and anamnestic data, are caused to a greater extent by platelet pathology. Currently, one of the methods for assessing the functional activity of the platelet link of hemostasis in laboratory practice is aggregometry.

Тромбоциты принимают участие в работе и регулировании сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, воспалении, ангиогенезе и иммунной системы [1, 2]. Активация и агрегация тромбоцитов играет ключевую роль в защитном гемостазе и патологическом тромбозе [3]. Для диагностики тромбоцитопатий необходимо проводить исследование спонтанной (естественной агрегации тромбоцитов, без добавления индуктора) и индуцированной агонистом агрегации. В настоящее время доступным клинико-лабораторным методом диагностики является агрегатометрия. Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводили на лазерном агрегометре «Биола» (Россия), регистрирующем агрегацию турбидиметрическим методом, а также методом, основанном на статистическом анализе флуктуаций светопропускания богатой тромбоцитами плазмы, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале, — ФСП-методом, позволяющим в реальном времени оценить средний размер агрегатов и используемым для изучения кинетики агрегации [4]. Высокая чувствительность метода позволяет исследовать «спонтанную агрегацию» и агрегационную активность тромбоцитов с применением низких доз индукторов. Оптический принцип исследования агрегационной активности тромбоцитов основан на изменении светопропускания образца богатой тромбоцитами плазмы (PRP) при образовании тромбоцитарных агрегатов. Светопропускание выражается в процентах, при этом светопропускание PRP принимается за 0 %, а светопропускание бедной тромбоцитами плазмы (PPP) — за 100 %. Применение различных индукторов позволяет оценить функциональную активность тромбоцитов, их рецепторный аппарат. Одними из основных типов тромбоцитарных рецепторов, отвечающих за полноту агрегации являются пуриновые, из которых выделяют P2Y12- и P2Y1-рецепторы, для которых основным лигандом является АДФ, причем для нормальной активации оба типа этих рецепторов должны экспонироваться клеткой [5]. У лиц с патологией щитовидной железы часто наблюдаются изменения гематологических параметров за счет влияния как самой щитовидной железы, так и гормонов, регулирующих ее работу [6]. Агрегатометрия — один из бюджетных способов первичной диагностики функциональных патологий тромбоцитов в условиях лечебного учреждения. Результаты нашего исследования показали снижение АДФ-индуцированной агрегации при одновременном повышении спонтанной агрегации тромбоцитов у пациентов с установленным гипотиреозом и узловым нетоксическим зобом, даже при компенсированном заместительной терапией левотироксином натрия.

© М. В. Чепис, Д. С. Сивкова, И. В. Ральченко, 2025

Литература

1. Kasirer-Friede A., Tjahjono W., Eto K., Shattil S. J. SHARPIN at the nexus of integrin, immune, and inflammatory signaling in human platelets // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. Vol. 116. P. 4983–4988.

2. Rayes J., Watson S. P., Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2 // J. Clin. Invest. 2019. Vol. 129. P. 12–23.

3. Sowton A. P., Millington-Burgess S. L., Murray A. J., Harper M. T. Rapid kinetics of changes in oxygen consumption rate in thrombin-stimulated platelets measured by high-resolution respirometry // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. Vol. 503, No. 4. P. 2721–2727.

4. Баркаган З. С., Момот А. П. Основные методы лабораторной диагностики нарушений системы гемостаза. М.: Ньюдиамед-АО, 2001. С. 224.

5. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors // Circulation Res. 2006. Vol. 99. P. 1293–1304.

6. Бышевский А. Ш., Галян С. Л., Сулкарнаева Г. А., Шаповалов П. Я. О роли щитовидной железы в регуляции гемостаза. М.: Мед. книга. 2006. С. 96.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-183

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ТОКСИЧЕСКИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА *

ANTIBACTERIAL AND TOXIC PHOTOSENSITIZING PROPERTIES OF FLAVIN MONONUCLEOTIDE

П. П. Шрам, Р. А. Акасов, Т. В. Егорова

Московский педагогический государственный университет

P. P. Shram, R. A. Akasov, T. V. Egorova

Moscow Pedagogical State University

✉ p.schram@yandex.ru

Аннотация

Эффективным методом лечения внутрибольничных инфекций в области хирургического вмешательства может стать интраоперационная антибактериальная фотодинамическая терапия. В работе исследовалось фотосенсибилизирующее действие флавинмононуклеотида на культуру бактерий *E. coli* и клеточную линию WI-26 при условиях, воспроизводимых во время хирургических операций.

Abstract

Intraoperative antibacterial photodynamic therapy may be an effective method for treating nosocomial infections in the surgical area. This study investigates the photosensitizing effect of flavin mononucleotide on the *E. coli* bacterial culture and WI-26 cell line under conditions reproduced during surgical operations.

Внутрибольничные инфекции в области хирургического вмешательства представляют серьезную проблему для медицины, что осложняется повсеместным ростом устойчивости к антибиотикам [1]. Одним из альтернативных методов лечения таких заболеваний является интраоперационная антибактериальная фотодинамическая терапия (аФДТ), действие которой основано на поглощении фотосенсибилизатором кванта света и образовании активных форм кислорода (АФК) [2].

Для интраоперационной аФДТ может быть использован эндогенный фотосенсибилизатор флавинмононуклеотид (ФМН), участвующий в образовании АФК в фотохимических реакциях как I, так и II типа [3]. Несколько исследователей подтвердили эффективность антибактериального действия ФМН, однако те условия не воспроизводимы во время хирургической операции [4].

Целью работы была оценка антибактериального и токсического действия ФМН *in vitro* в условиях, воспроизводимых при интраоперационной аФДТ.

Для оценки антибактериального фотосенсибилизирующего действия ФМН суспензии *E. coli* инкубировали в растворе ФМН в концентрациях от 0 до 5 мМ в течение 30 мин. Далее суспензии раскапывали в 96-луночный планшет и облучали светодиодом с длиной волны $\lambda = 450$ нм дозой 20 Дж/см^2. После облучения образцы растирали по поверхности питательной среды в чашках Петри и инкубировали в термостате при 37 °C в течение суток. Эффект оценивался по числу колониеобразующих единиц (КОЕ).

Результаты показали, что значения числа КОЕ бактерий *E. coli* при облучении в присутствии ФМН в концентрациях от 0,5 до 5 мМ статистически значимо снижались на 41,1–67,1 % соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, при исследуемых условиях ФМН обладает выраженным антибактериальным эффектом.

Для изучения токсического фотосенсибилизирующего действия ФМН клеточную линию фибробластов WI-26 вместе с необходимой питательной средой раскапывали в 96-луночный планшет по 1000 клеток на лунку. Адгезия клеток на дне лунок планшета позволяла заменять питательную среду. В первой и второй группе образцов питательная среда заменялась на среду с ФМН с концентрацией от 0 до 500 мкМ. Планшеты инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, после чего облучали светом с длиной волны $\lambda = 450$ нм в дозе 4 Дж/см^2. Через 5–10 мин питательную среду в образцах первой группы заменяли свежей без ФМН, а второй — оставляли без изменений. В третьей группе питательная среда заменялась на среду, которая была заранее подвергнута изолированному облучению с ФМН. Затем все группы образцов инкубировали в термостате трое суток, после чего оценивали выживаемость клеток по их метаболической активности тестом МТТ.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства просвещения РФ (№ 124031100005-5).

© П. П. Шрам, Р. А. Акасов, Т. В. Егорова, 2025

В первой группе образцов было повреждено до 10 % клеток, однако статистически значимых отличий выявлено не было. Во второй группе выживаемость клеток снизилась на 51,1–67,3 % в диапазоне 31,25–500 мкМ по сравнению с образцами темнового контроля ($p < 0,05$). Схожая картина наблюдалась при инкубации необлученных клеток с подвергшейся облучению средой с ФМН: при таких же концентрациях ФМН выживаемость снизилась на 52,9–69,7 % ($p < 0,05$). Тем самым удалось оценить вклад моментального и пролонгированного токсического действия ФМН на WI-26. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основной вклад в повреждающее фотосенсибилизирующее действие ФМН на фибробласты вносят образовавшиеся в окружающей среде продукты фотохимических реакций.

Таким образом, ФМН в исследуемых условиях обладает выраженным антибактериальным эффектом. Синий свет может безопасно использоваться во время хирургической операции, а доза 20 Дж/см^2 в условиях эксперимента достигается в течение нескольких минут. Изучение токсического действия ФМН на эукариотических клетках показало, что их повреждение в основном происходит продуктами фотохимических реакций. Это обстоятельство может быть учтено для защиты тканей пациента, если после облучения промыть рану.

Литература

1. Anderson D. J. Surgical site infections // Infectious Disease Clinics North America. 2011. Vol. 25, No. 1. P. 135–153.

2. Abrahamse H., Hamblin M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy // Biochem. J. 2016. Vol. 473, No. 4. P. 347–364.

3. Cardoso D. R., Libardi S. H., Skibsted L. H. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality // Food Function. 2012. Vol. 3, No. 5. P. 487–502.

4. Wong T. W., Cheng C. W., Hsieh Z. J., Liang J. Y. Effects of blue or violet light on the inactivation of Staphylococcus aureus by riboflavin-5´-phosphate photolysis // J. Photochem. Photobiol. B, Biology. 2017. Vol. 173. P. 672–680.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-184

ИНТЕГРАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ, МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ И РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ НЕДАВНО ОБНАРУЖЕННЫХ ВИРУСОВ (*BEIJI NAIROVIRUS* И *SONGLING VIRUS*) *

INTEGRATION OF COMPUTATIONAL MODELING, SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING AND X-RAY CRYSTALLOGRAPHY TO STUDY THE STRUCTURE OF NUCLEOPROTEINS OF NEWLY DISCOVERED VIRUSES (*BEIJI NAIROVIRUS* AND *SONGLING VIRUS*)

А. О. Яншин[1,2], А. В. Гладышева[1]

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

A. O. Yanshin[1,2], A. V. Gladysheva[1]

[1] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ a.yanshin@g.nsu.ru

Аннотация

За последние годы выявлены новые вирусы семейства *Nairoviridae* — *Beiji nairovirus* (BJNV) и *Songling virus* (SGLV), вызывающие тяжелые заболевания. В работе впервые изучены структуры их нуклеопротеинов с помощью нейросети Alphafold 3, малоуглового рентгеновского рассеяния и рентгеноструктурного анализа на синхротронном излучении.

Abstract

In recent years, new viruses of the *Nairoviridae* family have been identified — Beiji nairovirus (BJNV) and Songling virus (SGLV), which cause severe diseases. In this work, the structures of their nucleoproteins were studied for the first time using the Alphafold 3, small-angle X-ray scattering, and X-ray structural analysis on synchrotron radiation.

За последние годы с применением современных методов секвенирования было обнаружено множество новых клещевых вирусов семейства *Nairoviridae*, включая *Beiji nairovirus* (BJNV) и *Songling virus* (SGLV), вызывающих эпидемические вспышки и серьезные заболевания у людей и животных [1, 2]. Изучение структурных особенностей нуклеопротеинов, обеспечивающих защиту и репликацию вирусного генома, является ключевым для разработки эффективных вакцин и антивирусных препаратов. В настоящее время структурные данные по нуклеопротеинам этих вирусов полностью отсутствуют, что ограничивает возможности создания действенных средств борьбы с этими вирусами. В этой связи использование синхротронного излучения (СИ) становится критически важным и на сегодняшний день единственным методом для получения достоверной трехмерной структуры белков новых вирусов на атомном уровне. Современные достижения в области нейросетей дают возможность с высокой точностью предсказывать третичную структуру белков на основе анализа больших биологических баз данных, значительно упрощая интерпретацию дифракционных экспериментов. Таким образом, интеграция синхротронных технологий и искусственного интеллекта представляет собой новый, современный подход для изучения структуры нуклеопротеинов новых опасных для человека вирусов, что имеет решающее значение для разработки профилактических и терапевтических средств в борьбе с новыми вирусными угрозами.

Целью работы является комплексное изучение структуры нуклеопротеинов недавно обнаруженных вирусов *Beiji nairovirus* и *Songling virus* посредством интеграции современных методов вычислительного моделирования, малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и рентгеноструктурного анализа (РСА) с использованием СИ.

В результате исследования впервые получены модели третичных структур нуклеопротеинов SGLV и BJNV с помощью нейросети Alphafold 3, выявлены их конформационные особенности и РНК-связывающие участки, важные для вирусной функции. Нуклеопротеины BJNV и SGLV обладают двухдоменной структурой, один из которых содержит «карман» для связывания РНК и является «жестким», а второй обладает большой гибкостью

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение от 30.05.2025 № 075-15-2025-452).

© А. О. Яншин, А. В. Гладышева, 2025

в конформационных изменениях, что может приводить к различиям в специфичности и эффективности вирусной репликации. По данным гель-эксклюзионной хроматографии и динамического рассеяния света установлено, что нуклеопротеины существуют в мономерной форме в растворе, размер мономера SGLV составил 6,02 ± 1,8 нм, тогда как размер мономера BJNV — 8,47 ± 2,05 нм. Впервые разработаны оптимальные условия кристаллизации: кристаллы с белковой дифракцией, протестированные на станции СИ — BL17 SSRF (г. Шанхай, Китай), получены при температуре 20 °C, в растворе 20 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 7,5 с концентрацией белка 26 mg/ml и использовании подбора условий кристаллизации с помощью роботизированной системы Mosquito Xtal3, рост кристаллов продолжался в течение одной недели наблюдений. Несколько кристаллов обеспечивали дифракцию до разрешения 2,5 Å, выращивание которых происходило при условиях: кристаллизационный набор Morheus II, соли: 90 mM LiNaK 0,1 M, буфер — pH 6,5, MOPSO, Bis-Tris, 50 % v/v, смесь осадительных агентов 1–30 % w/v PEG 3000, 40 % v/v 1, 2, 4-Butanetriol, 2 % w/v NDSB 256, путем смешивания 150 нл белка с равным объемом кристаллизационного раствора, смесь осадительных агентов 2–25% w/v PEG 4000, 40 % w/v 1,2,6-Hexanetriol в пропорции 200 нл раствора белка с 100 нл кристаллизационного раствора. Экспериментальные профили МУРР, собранные на станции СИ BL19U2 SSRF (г. Шанхай, Китай), позволили определить радиус вращения белковых молекул (Rg) равный 2,7 ± 0,1 — 3,1 ± 0,1 нм, линейный молекулярный размер (Dmax) приблизительно 9–10 нм и молекулярную массу 47,6–62,0 кДа, которая незначительно варьируется в зависимости от концентрации. Также впервые были восстановлены структуры низкого разрешения нативных конформаций N SGLV и N BJNV растворе. Эти данные подтвердили предсказанные нейросетью Alphafold 3 модели. Полученные результаты имеют принципиальное значение для разработки превентивных мер противодействия вирусным угрозам. В частности, выявленные РНК-связывающие области и конформационные особенности нуклеопротеинов могут служить мишенями для создания новых вакцин и противовирусных препаратов.

Литература

1. Ma J. et al. Identification of a new orthonairovirus associated with human febrile illness in China // Nat. Med. 2021. Vol. 27, No. 3. P. 434–439.

2. Wang Y. C. et al. A new nairo-like virus associated with human febrile illness in China // Emerging Microbes Infections. 2021. Vol. 10, No. 1. P. 1200–1208.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-185

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНАПТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ И ФУНКЦИЙ КЛЕТОК МОЗЖЕЧКА С ПОМОЩЬЮ ИХ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

RESEARCH ON SYNAPTIC CONNECTIONS AND FUNCTIONS OF CEREBELLUM CELLS USING COMPUTER MODELING

А. С. Яровой[1], А. П. Синицина[1], В. А. Цвелая[1,2], В. Л. Дунин-Барковский[3]

[1]*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*
[2]*Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*
[3]*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

A. S. Yarovoy[1], A. P. Sinitsyna[1], V. A. Tsvelaya[1,2], W. L. Dunin-Barkowski[3]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny*
[2]*Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*
[3]*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*

✉ saturn1659@gmail.com

Аннотация

Модели, основанные на нейронной активности, могут использоваться в системах управления, разработке нейронных сетей и вычислительных экспериментах. В настоящей работе рассматривается разработка компьютерной модели группы клеток в мозжечке, образующих контур с обратной положительной связью. Результаты работы в дальнейшем будут использоваться для разработки ИИ-систем и вычислительных экспериментов *in silico*.

Abstract

Models based on neural activity can be used in control systems, neural network development, and computational experiments. This paper discusses the development of a computer model of a group of cells in the cerebellum that form a positive feedback loop. The results of this work will be further used for the development of AI systems and *in silico* computational experiments.

Модель, основанная на клеточной структуре и синаптических связях мозжечка, может значительно улучшить точность предсказаний и адаптивность ИИ-систем благодаря более эффективным способам обучения и настройки весов. Также моделирование обработки сенсорной информации мозжечком имеет потенциал для создания более точных когнитивных систем, которые могут использоваться для разработки биоморфных систем управления. Модель нейронной активности в мозжечке может использоваться в вычислительных экспериментах, когда постановка эксперимента *in vivo* затруднена или невозможна.

Основной целью работы является разработка модели искусственной нейронной сети на основе клеточной структуры и синаптических связей в мозжечке. Для этого было смоделировано взаимодействие между гранулярными клетками, лианной клеткой, клеткой Пуркинье и клетками ядер в замкнутом контуре с биологической обратной связью. Помимо этого, были рассмотрены несколько способов реализации пластических связей между гранулярными и клетками Пуркинье.

Контур положительной обратной связи состоит из клеток Пуркинье, оказывающих тормозное воздействие на малые клетки ядер, которые, в свою очередь, тормозят лианные клетки, возбуждающие по лианным волокнам клетки Пуркинье (рис. 1) [1]. Данный контур моделировался с помощью программной среды Nest Simulator, которая широко используется в вычислительной нейробиологии.

Вначале было смоделировано взаимодействие между гранулярными клетками и клеткой Пуркинье. 300 гранулярных клеток в случайный момент времени активировались с частотой от 10 до 100 Гц дважды за симуляцию, которая длилась 500 мс [2]. Это позволило подобрать начальные веса, при которых частота спайков на клетке Пуркинье была около 50 Гц.

После этого в модель были добавлены малые клетки ядер и лианные клетки. Биофизические параметры всех клеток были взяты из источников [3–5]. Для точного отражения свойств нейронов разных типов использовалась модель спайковой активности нейронов Conductance-based generalized leaky integrate and fire (glif_cond). У всех клеток была фоновая активность, реализованная с помощью встроенных инструментов: генераторов спайков и генераторов постоянного тока. В результате была успешно реализована положительная обратная связь

© А. С. Яровой, А. П. Синицина, В. А. Цвелая, В. Л. Дунин-Барковский, 2025

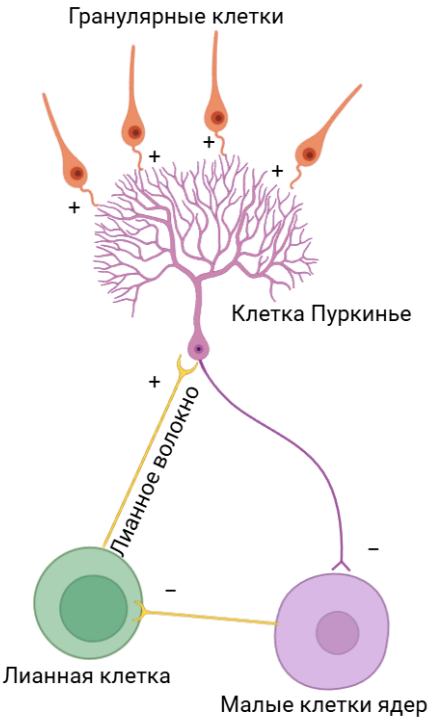


Рис. 1. Контур с обратной положительной связью в мозжечке

в контуре. При возбуждении клетки Пуркинье на малые клетки ядер (далее МКЯ) поступал тормозной сигнал, который менял напряжение на модельных клетках и снижал частоту спайков (рис. 2). Так, первые 100 мс симуляции множество спайков клетки Пуркинье не давали МКЯ возбудиться, а фоновая активность в остальное время тормозила МКЯ. Аналогичную активность создают МКЯ на синапсах лианных клеток.

Далее было необходимо реализовать пластическую связь между гранулярными клетками и клетками Пуркинье. Эти синапсы реализуют как долговременную депрессию, так и потенциацию, обе формы которых лежат в основе сенсомоторного обучения [6]. Для реализации данной связи использовались уравнения из статьи [1]. В результате в модельных условиях веса сходились к константе. Дополнительно были рассмотрены возможности использования встроенных в Nest Simulator типов синапсов. Наиболее подходящими для описания пластичной связи оказались stdp_synapse и tsodyks_synapse.

Таким образом, была разработана модель контура в мозжечке с положительной обратной связью и пластичными синапсами. Результаты работы в дальнейшем будут использоваться для разработки биоморфных нейронных сетей нового поколения и вычислительных экспериментов *in silico*.

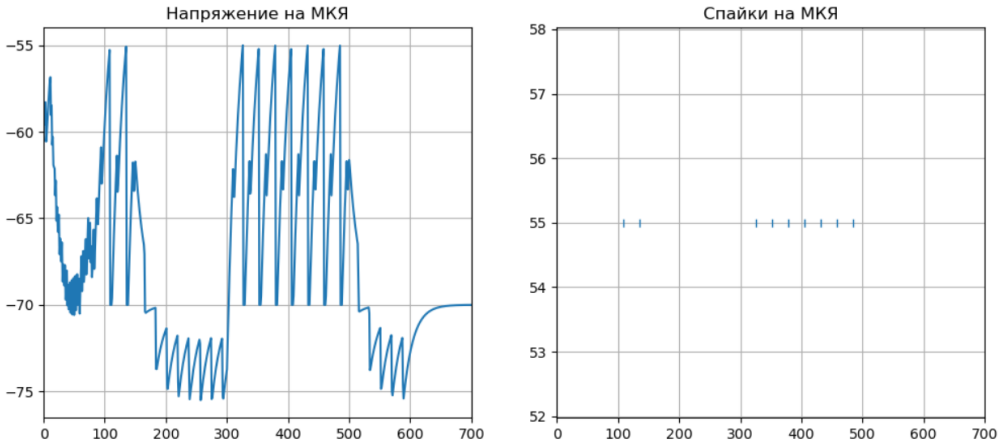


Рис. 2. Напряжение (*слева*) и количество спайков (*справа*) на МКЯ (по оси абсцисс время симуляции в мс)

Литература

1. Dunin-Barkowski W. L. Amalysis of output of all Purkinje cells controlled by one climbing fiber cell // Neurocomputing. 2002. Vol. 44–46. P. 391–400.

2. Shakirov V. et al. Cerebellar plasticity based equalization of total input to inferior olive cells // Neurosci. Behavioral Physiol. 2023. Vol. 53. P. 739–751.

3. Chadderton P. et al. Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing // Nat. 2004. Vol. 428. P. 856–860.

4. Devor A., Yarom Y. Generation and Propagation of Subthreshold Waves in a Network of Inferior Olivary Neurons // J. Neurophysiol. 2002. Vol. 87. P. 3059–3069.

5. Uusisaari M. et al. Morphological and Electrophysiological Properties of GABAergicand Non-GABAergic Cells in the Deep Cerebellar Nuclei // J. Neurophysiol. 2007. Vol. 97. P. 901–911.

6. Voerman S. et al. Plasticity mechanisms of genetically distinct Purkinje cells // BioEssays. 2024. Vol. 46. P. e2400008.

РАЗДЕЛ IV

ВИРУСОЛОГИЯ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-186

EFFECTS OF HUMAN SFPQ PROTEIN ON THE INITIAL STAGES OF HIV-1 LIFE CYCLE *

T. F. Kikhai[1], Yu. Yu. Agapkina[1,2], M. B. Gottikh[1,2]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University*

✉ kih.t1996@yandex.ru

Abstract

We have demonstrated that human SFPQ protein acts as a positive regulator of the integration and postintegration repair steps of HIV-1 replication. SFPQ binds to IN via two N-terminal RGG motifs. Substitution of Arg in these motifs disrupts this binding, and SFPQ with these substitutions does not affect integration efficiency but enhances postintegration repair as well as the wild-type protein.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) causes one of the most dangerous incurable infectious pathologies. Highly active antiretroviral therapy (HAART), aimed at suppressing the functions of viral proteins, significantly improves the quality and life expectancy of infected people, but HIV-1 can develop resistance to it. The virus uses numerous cellular proteins to ensure its replication, which opens up new directions in the development of drugs that block interactions between viral and cellular proteins. In this regard, studying the molecular mechanisms of the cellular proteins' involvement in the processes of HIV-1 replication is an important task for the creation of innovative therapeutic agents.

The SFPQ protein (Splicing Factor, Proline- and Glutamine-rich) is involved in alternative splicing, transcription and transport of mRNA in the cell [1]. SFPQ is also known to participate in the HIV-1 life cycle. It is a part of the preintegration complex (PIC), which includes viral reverse transcriptase (RT) and integrase (IN). Direct interaction of SFPQ with HIV-1 IN has been shown *in vitro* [2]. However, the molecular mechanisms of SFPQ influence on HIV-1 replication remain poorly understood. The aim of this study was to identify the role of SFPQ in the early stages of the HIV life cycle.

To determine the specific stage of the HIV life cycle affected by SFPQ, a VSV-G pseudotyped, replication-incompetent lentiviral vector encoding firefly luciferase instead of HIV-1 enzymes was used. This vector adequately mimics early stages of the viral life cycle, including reverse transcription, integration, and post-integration repair. The levels of HIV-1 single cycle infection were quantified by measuring luciferase activity. The results showed that SFPQ acts as a positive factor for integration and post-integration repair.

In order to clarify the mechanism of the positive effect of SFPQ, the interaction of recombinant SFPQ with viral enzymes (IN and RT) was analyzed using the pull-down assay, and it was found that SFPQ interacts with IN, but not with RT. Using site-directed mutagenesis and pull-down analysis, two RGG motifs in the N-terminal domain of SFPQ were identified that are responsible for the interaction with IN. The protein with the substitution of Arg residues in these motifs did not bind to IN, and its superexpression in HEK 293T cells transduced with the pseudoviral vector did not affect the efficiency of integration, but increased the level of post-integration repair almost as well as the superexpression of the wild-type SFPQ protein. Thus, it was established for the first time that the cellular SFPQ protein positively affects two stages of the HIV-1 life cycle, and its effect on integration is mediated by its interaction with IN, but not on post-integration repair.

References

1. Knott G. J., Bond C. S., Fox A. H. The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1:a multipurpose molecular scaffold // Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44 (9). P. 3989–4004.

2. Yadav P., Sur S., Desai D. et al. Interaction of HIV-1 integrase with polypyrimidine tract binding protein and associated splicing factor (PSF) and its impact on HIV-1 replication // Retrovirology. 2019. Vol. 16. P. 12.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #22-14-00073-P).

© T. F. Kikhai, Yu. Yu. Agapkina, M. B. Gottikh, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-187

GENETIC DIVERSITY AND MOLECULAR ANALYSIS OF HUMAN PARAINFLUENZA VIRUS TYPES 1 AND 3 IN SAINT PETERSBURG, RUSSIA

O. Mansour, D. M. Danilenko, A. B. Komissarov

Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

✉ olamansor1995@gmail.com

Abstract

Human parainfluenza viruses (hPIVs) are important pathogens, responsible for acute respiratory tract diseases especially in young children. Due to the limited information of hPIV1 and hPIV3 circulation and their diversity pattern in Russia, the aim of this study was to perform a molecular and genetic characterization of these viruses in Saint Petersburg, Russia.

Human parainfluenza viruses (hPIVs) are important leading causes of upper and lower respiratory tract infections (RTIs), responsible for a wide spectrum of clinical illnesses, ranging from common cold, to severe lower respiratory tract diseases, such as pneumonia and bronchiolitis [1, 2]. The most vulnerable groups to these viruses are infants, the elderly, and immuno-compromised individuals [3]. hPIVs are members of the family *Paramyxoviridae*. They have non-segmented, negative sense, single stranded RNA genomes. Based on genetic and antigenic criteria, they have been classified into two genera, among which hPIV1 and hPIV3 belong to the genus *Respirovirus*, whereas hPIV2 and hPIV4 are classified as members of the genus *Rubulavirus* [1].

In Russia, the epidemiology and economic impact of hPIV1 and hPIV3 infections are undetermined. As comprehensive information of molecular and genetic characterization is missing, the present study was designed to elucidate the genetic diversity and phylogenetic analysis of hPIV1 and hPIV3, circulating in Saint Petersburg, Russia, in a period of eight years (2017–2025) through the whole genome-based genetic and phylogenetic analysis of these pathogens.

For both hPIV1 and hPIV3, two sets of 18 primer pairs each were designed to achieve full genome coverage. These primer designs were based on consensus sequence genomes obtained from multiple alignments of complete 227 hPIV1 and 419 hPIV3 genomes available in NCBI. Each primer pair covers approximately 1 kb of the genome with about 200 bp overlap of amplicons. The research was conducted at the laboratory of molecular virology of Smorodintsev Research Institute of Influenza (St. Petersburg, Russia). Detection of respiratory pathogens was carried out by real-time PCR using commercial kits "AmpliSens® ARVI-screen-FL" assay (Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia), in accordance with the manufacturer's instructions. Positive samples with Ct < 25 were selected for further whole genome amplification, using the developed primer panels. For each sample, two separate multiplex RT-PCR reactions (pools 1 and 2) were performed using the Biolabmix BioMaster RT-PCR–Premium (2×) kit, according to the manufacturer's recommendations. PCR products were subsequently sequenced on both Illumina NextSeq 2000 platform and MGI DNBSEQ G-400 platform. Nucleotide acid and deduced amino acid sequences of hPIV1 and hPIV3 were analyzed and aligned with MAFFT software. Phylogenetic trees were constructed with the maximum likelihood (ML, GTR+G) method using RAxML and TreeSub programs. The generated phylogenetic tree was visualized using the FigTree tool v1.4.4.

As a result of this study, 109 hPIV1 and 303 hPIV3 sequences were first obtained and documented in Russia. The whole-genome-based ML phylogenetic tree of hPIV1 sequences identified four distinct clades: A, B, C, and D. The Russian strains were distributed across clades B, C, and D, with clade C containing the majority of them. Similarly, the phylogenetic tree of hPIV3 strains delineated four genetic clusters A, B, C and D, emphasizing the emergence of a novel cluster D for the first time. Russian hPIV3 strains were primarily grouped into clusters C and D; further dividing into subclusters C5a, C5b, C3b, C3e and C3a. Most of the isolates were assigned to subcluster C3a, followed by C5b.

These findings shed light on the dynamic nature of both hPIV1 and hPIV3 and strongly underscore the critical need for further global surveillance and molecular analyses for better understanding of the viruses' circulation patterns and genetics.

References

1. Karron R. A., Collins P. L. Parainfluenza Viruses // Fields Virol. 6th Ed. 2013. P. 1044–1079.

2. Schomacker H., Schaap-Nutt A., Collins P. L., Schmidt A. C. Pathogenesis of Acute Respiratory Illness Caused by Human Parainfluenza Viruses // Curr. Opin. Virol. 2012. Vol. 2. P. 242–264.

3. Henrickson K. Parainfluenza Viruses // Clin. Microbiol. Rev. 2003. Vol. 16. P. 242–264.

© O. Mansour, D. M. Danilenko, A. B. Komissarov, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-188

НОВЫЕ КРИТЕРИИ ВИДА ДЛЯ АСТРОВИРУСОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ОПИСАТЕЛЬНЫЕ (РАЗЛИЧИЕ ГЕНОМОВ) И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ (РЕПРОДУКТИВНЫЙ БАРЬЕР) *

NEW SPECIES CRITERIA FOR MAMMALIAN ASTROVIRUSES: DESCRIPTIVE (GENOME DIFFERENCES) AND FUNCTIONAL (REPRODUCTIVE BARRIER)

Ю. А. Алешина[1,2], А. Н. Лукашев[1,3]

[1] *Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Сеченовского университета, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3] *НИИ системной биологии и медицины, Москва*

Y. A. Aleshina[1,2], A. N. Lukashev[1,3]

[1] *Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*
[3] *Scientific Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow*

✉ vjulia94@gmail.com

Аннотация

В настоящей работе предложены новые критерии вида для астровирусов млекопитающих (род *Mamastrovirus*) на основе анализа всех доступных последовательностей геномов: сходство по последовательности ORF1b (РНК-зависимая РНК-полимераза); согласованность группирования на филогенетических деревьях, построенных по участкам генома ORF1b и ORF2; основной хозяин вируса.

Abstract

New species criteria for mammalian astroviruses (genus *Mamastrovirus*) are suggested based on the analysis of all available genome sequences: similarity in the ORF1b (RNA-dependent RNA polymerase) sequence, consistency of grouping on phylogenetic trees constructed for ORF1b (polymerase) and ORF2 (capsid) genome regions, and the major virus host.

Астровирусы — это группа небольших безоболочечных вирусов с РНК-геномом положительной полярности относительно мРНК, заражающих млекопитающих и птиц. В семействе выделяют два рода — *Mamastrovirus* и *Avastrovirus*, вирусы которых заражают птиц и млекопитающих соответственно. На основе сходства более 75 % в аминокислотной последовательности (p-distance) открытой рамки считывания ORF2, кодирующей белки капсида, выделяют 19 видов астровирусов млекопитающих и три вида астровирусов птиц [1–3]. В последние годы были отсеквенированы сотни последовательностей новых астровирусов млекопитающих, при этом более половины новых вирусов не могут быть отнесены к существующим видам рода *Mamastrovirus*. При этом анализ распределения попарных расстояний всех последовательностей ORF2 астровирусов млекопитающих, доступных в NCBI Nucleotide (N = 894), показал, что принятый порог сходства не позволяет разделить некоторые принятые виды астровирусов млекопитающих (*Mamastrovirus 1* / *Mamastrovirus hominis* и *Mamastrovirus 2* / *Mamastrovirus felis*) и не может быть использован для классификации новых последовательностей вирусов, выделенных из крупного рогатого скота и свиней. Также в связи с высокой вариабельностью этого участка генома построение качественного множественного выравнивания, отражающего эволюцию последовательностей, на уровне рода *Mamastrovirus* затруднительно.

Для того чтобы выявить механизмы, обеспечивающие генетическое разнообразие астровирусов, которые могли бы поддерживать разделение астровирусов на виды, был проведен систематический анализ полногеномных последовательностей астровирусов (N = 478). Анализ распределения расстояний в других участках генома астровирусов выявил, что порог в 17 % различий в нуклеотидной последовательности ORF1b (РНК-зависимая РНК-полимераза) позволяет разделить принятые виды и выделить несколько групп среди неклассифицированных астровирусов — предполагаемых видов. Группы неклассифицированных вирусов образовывали хорошо поддержанные клады (ультрабыстрый бутстреп > 90 %) на филогенетических деревьях, построенных по ORF1a, ORF2 и ORF2, и согласовывались с хозяевами вирусов. С помощью алгоритмов детекции единичных

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00230-П).
© Ю. А. Алешина, А. Н. Лукашев, 2025

событий рекомбинации, реализованных в программе RDP4, был проведен анализ рекомбинации на уровне рода *Mamastrovirus*. Точки разрыва рекомбинации были детектированы практически во всех участках генома, однако можно выделить три горячие точки рекомбинации: чаще всего рекомбинация встречалась на стыке ORF1b (РНК-зависимая РНК-полимераза) / ORF2 (белки капсида), реже — на 3'-конце ORF1a и на стыке ORF1a/ORF1b. При этом рекомбинация наблюдалась только между вирусами, принадлежащими одному виду — общепринятому или предполагаемому виду на основе нового дистанционного критерия, что говорит о репродуктивной изоляции между вирусами разных видов. Таким образом, порог в 17 % различий в нуклеотидной последовательности ORF1b обеспечивает лучшее соответствие между принятой на данный момент классификацией, репродуктивной изоляцией вирусов, которая выражается в филогенетическом группировании вирусов одного вида на деревьях, построенных по участкам, кодирующим капсидные белки и полимеразу, и хозяином вируса [4]. Предложение с введением новых критериев вида для астровирусов млекопитающих и выделением новых 8 видов было подано в международный комитет по таксономии вирусов ICTV.

Литература

1. Bosch A., Guix S., Krishna N. K. et al. Family — Astroviridae // Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam, the Netherlands: Elseiver, 2012. P. 953–959.

2. Bosch A., Pintó R. M., Guix S. Human astroviruses // Clin. Microbiol. Rev. 2014. Vol. 27 (4). P. 1048–1074.

3. Donato C., Vijaykrishna, D. The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses // Viruses. 2017. Vol. 9 (5). P. 1–18.

4. Aleshina Y., Lukashev A. Mamastrovirus species are shaped by recombination and can be reliably distinguished in ORF1b genome region // Virus Evol. 2025. Vol. 11 (1). veaf006.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-189

РАЗРАБОТКА НОВОГО ПОДХОДА ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ РЕГИОНОВ ВИРУСОВ С СЕГМЕНТИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ НА ПРИМЕРЕ *KINDIA TICK VIRUS* *

THE DEVELOPMENT OF A NEW APPROACH FOR STUDYING THE STRUCTURE OF UNTRANSLATED REGIONS IN VIRUSES WITH SEGMENTED GENOMES USING THE *KINDIA TICK VIRUS* AS A MODEL

Д. А. Алхиреенко, А. В. Гладышева

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

D. A. Alkhireenko, A. V. Gladysheva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ darya.a.00@yandex.ru

Аннотация

Исследование структуры РНК является сложной и трудоемкой задачей вследствие ее подвижности и нестабильности в растворе. В настоящей работе для исследования структуры 5′- и 3′-нетранслируемых регионов (UTR) РНК *Kindia tick virus* разработана методика со-кристаллизации РНК с РНК-связывающим белком оболочки фага MS2, а также впервые получены пространственные структуры низкого разрешения 5′ и 3′ UTR РНК KITV методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

Abstract

Studying the structure of RNA is a complex and time-consuming task due to its mobility and instability in solution. In this work, to study the structure of 5′ and 3′ untranslated regions (UTRs) of Kindia tick virus RNA has developed a technique for co-crystallizing RNA with the RNA-binding coat protein from the MS2 phage, and low-resolution spatial structures of 5′ and 3′ UTR KITV RNA have been obtained for the first time by small-angle X-ray scattering.

Kindia tick virus (KITV) — недавно обнаруженный вирус группы *Jingmenvirus* семейства *Flaviviridae*, впервые обнаруженный в 2017 г. в иксодовых клещах на территории г. Киндия Гвинейской Республики. В отличие от классических вирусов семейства *Flaviviridae*, геном KITV состоит из 4 сегментов, каждый из которых фланкирован 5′ и 3′ UTR. Эти регионы играют важную роль в репликации, трансляции и упаковке вирусной РНК, формируя функциональные вторичные структуры.

Ранее проведенное компьютерное моделирование вторичной структуры 5′ и 3′ UTR РНК KITV выявило регуляторные элементы, характерные для рода *Orthoflavivirus* [1], что указывает на их эволюционную и функциональную значимость. Изучение пространственной структуры 5′ и 3′ UTR KITV поможет раскрыть механизмы работы его генома и разработать методы борьбы с этим малоизученным вирусом. Однако получение пространственной структуры РНК является сложной и трудоемкой задачей вследствие ее подвижности и нестабильности в растворе.

В настоящей работе была разработана методика сокристаллизации РНК с РНК-связывающим белком оболочки фага MS2 (белок MS2) на основе системы MS2-тегинга, которую используют для визуализации РНК в клетках. Белок MS2 связывается со шпилькой, которая образована специфичной последовательностью РНК длиной 18 нуклеотидов (MS2-тег). Эту последовательность вводили в исследуемую РНК таким образом, чтобы она не влияла на нативную структуру. Нами было собрано 26 генетических конструкций, содержащих ДНК-копии нативных и химерных (содержащих MS2-тег) вариантов 5′ и 3′ UTR РНК всех четырех сегментов KITV для двух изолятов KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Далее проводили наработку РНК 5′ и 3′ UTR 1-го и 3-го сегментов KITV *in vitro* Т7-полимеразой и отчищали. Для исследования структуры РНК на синхротронном источнике методом малоуглового рентгеновского рассеяния образцы должны соответствовать определенным параметрам, а именно: чистота образца не менее 95 %, преобладание целевой формы молекулы и концентрация не менее 1 мг/мл. Вследствие чего для 10 образцов РНК-транскриптов 5′ и 3′ UTR 1-го и 3-го сегментов KITV удалось оптимизировать условия наработки, и с них были получены экспериментальные кривые малоуглового рассеяния на станции BL19U2 Шанхайского центра синхротронного излучения, по которым были рассчитаны общие структурные параметры, такие как молекулярная масса и радиус инерции. Численные показатели экспериментально посчитанных и теоретически посчитанных молекулярных масс укладываются в интервал молекулярных

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение от 30.05.2025 № 075-15-2025-452).

© Д. А. Алхиреенко, А. В. Гладышева, 2025

масс, получаемых различными способами, что принципиально важно для дальнейшей оптимизации методик для подготовки РНК к сокристаллизации с модельным белком оболочки фага MS2 и белками KITV. Радиус инерции свидетельствует о том, что биомолекулы химерных и нативных 5′ и 3′ UTR РНК KITV формируют в растворе компактные упорядоченные структуры. Введение MS2-tag в структуру 5′ и 3′ UTR РНК KITV не влияет на изменение радиуса инерции биомолекул в растворе. Кроме того, измеренный размер биомолекул химерных и нативных 5′ и 3′ UTR РНК KITV напрямую коррелирует с длиной нуклеотидных последовательностей и молекулярными массами 5′ и 3′ UTR РНК KITV.

Для трех пар нативных и химерных вариантов 5′ UTR РНК 1-го сегмента KITV, 5′ и 3′ UTR РНК 3-го сегмента изолята KITV/2018/1 были восстановлены пространственные структуры, которые демонстрируют схожую вытянутую, но компактную форму. При попарном наложении пространственных структур нативных вариантов с химерными UTR РНК KITV не выявлено значительных различий формы, что говорит об отсутствии влияния MS2-tag на структуру нативных 5′ и 3′ UTR РНК KITV. Это делает возможным использование системы «MS2-тегинга» для исследования структуры 5′ и 3′ UTR РНК KITV с помощью белка оболочки фага MS2 для сокристаллизации комплексов белок-РНК в целях дальнейшего рентгеноструктурного анализа. Экспериментальное подтверждение структуры 5′ и 3′ UTR РНК KITV с помощью рентгеноструктурного анализа позволит установить роль UTR вирусной РНК в реализации генетической информации новых флавиподобных вирусов с сегментированным геномом.

Литература

1. Tsishevskaya A.A., Alkhireenko D.A., Bayandin R.B. et al. Untranslated Regions of a Segmented Kindia Tick Virus Genome Are Highly Conserved and Contain Multiple Regulatory Elements for Viral Replication // Microorganisms. 2024. Vol. 12 (2). P. 239.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-190

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ S В ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА *

DETECTION OF POTATO VIRUS S IN COLORADO POTATO BEETLE RNA-SEQ DATA

М. Е. Антонец[1], С. А. Боднев[2], У. Н. Роцкая[1], В. Ю. Крюков[1], Д. В. Антонец[3]

[1] *Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск*
[2] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3] *Институт искусственного интеллекта Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

M. E. Antonets[1], S. A. Bodnev[2], U. N. Rotskaya[1], V. Yu. Kryukov[1], D. V. Antonets[3]

[1] *Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk*
[2] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[3] *Artificial Intelligence Institute, Lomonosov Moscow State University*

✉ starchevskayamaria@mail.ru

Аннотация

Представлен частичный геном вируса картофеля S (PVS), собранный из транскриптомных данных колорадского жука, полученных из биологических образцов, собранных в Новосибирской области. Проведена сборка и филогенетический анализ геномных последовательностей PVS, полученных из публичных данных. Полученные результаты указывают на широкое присутствие типичных штаммов PVS в данных колорадского жука и потенциальную роль жука в передаче вируса.

Abstract

A partial genome of potato virus S (PVS) is presented assembled from transcriptomic data obtained from Colorado potato beetle biological samples collected in Novosibirsk region. Assembly and phylogenetic analysis of PVS genomic sequences obtained from publicly available data was performed. The results indicate a widespread presence of typical PVS strains in Colorado potato beetle data and a potential role of the beetle in virus transmission.

Вирус картофеля S (PVS) — широко распространенный патоген картофеля, обычно вызывающий легкие или бессимптомные инфекции. Тем не менее некоторые генотипы могут вызывать потери урожая до 20 %, особенно при коинфекции другими вирусами [1]. Филогенетический анализ различных изолятов PVS с использованием генов RdRp, TGB и CP выявил три филогруппы: PVS^{I}, PVS^{II} и PVS^{III} [2]. Изоляты группы PVS^{I} демонстрируют высокую генетическую изменчивость и широко распространены на всех континентах. Группа PVS^{II} преимущественно встречается в Южной Америке (Боливия, Чили, Колумбия, Эквадор, Перу, Бразилия), с недавними обнаружениями в Кении, Новой Зеландии, Китае, Нидерландах и Казахстане. Несмотря на меньшую распространенность, PVS^{II} легче передается тлями и контактным путем, потенциально вызывая более серьезные симптомы у картофеля, что представляет угрозу биологической безопасности для стран, все еще свободных от этого вируса [2]. PVS в основном распространяется механическим путем через зараженный растительный материал [3], а также различными видами тлей, включая *Aphis nasturtii* и *Myzus persicae*, полуперсистентным способом [4]. В отличие от тлей, жуки не считаются переносчиками PVS. Однако известно, что более 70 видов жуков переносят различные вирусы растений, поражающие овощи и злаки, что составляет примерно 11 % всех вирусов, передаваемых насекомыми [5]. Колорадский жук — известный вредитель картофеля. Учитывая питание колорадского жука листьями картофеля и его широкое распространение, можно предположить, что колорадский жук способен приобретать и распространять вирусы картофеля во время питания. Технологии высокопроизводительного секвенирования позволяют обнаруживать вирусный генетический материал в различных типах образцов, включая насекомых-переносчиков. Однако ограниченное число исследований было сосредоточено на поиске вирусов растений в потенциальных насекомых-переносчиках. Идентификация вирусных последовательностей у насекомых может выявить ассоциации «вирус — переносчик» и новые эпидемиологические пути.

Нами были выбраны 218 образцов транскриптомных данных, сгруппированные в 17 проектов, полученных из NCBI SRA, 114 образцов из 9 проектов содержали генетический материал PVS. При этом в 86 образцах последовательности PVS были собраны более чем на 97 % от референсной (NC_007289.1) с достоверной глуби-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00309).
© М. Е. Антонец, С. А. Боднев, У. Н. Роцкая, В. Ю. Крюков, Д. В. Антонец, 2025

ной покрытия более 20х. Стоит отметить, что в некоторых образцах процент прочтений, принадлежащих PVS, достигает почти 7 %.

В результате анализа метагеномных образцов колорадского жука, полученных ранее в нашей лаборатории (номер NCBI SRA BioProject: PRJNA1013476), были выявлены вирус-позитивные контиги, таксономически принадлежащие PVS. В результате сборки генома был получен частичный геном PVS (номер в GenBank: OR797635.1), Potato virus S isolate CPB3. Представленная геномная последовательность имеет длину 8456 нт и содержит характерные для PVS открытые рамки трансляции, включая RdRp, тройной генный блок (25K, 12K, 7K), CP, за исключением гена 11K, в котором не были прочитаны 85 нт. Наилучший процент идентичности в результате поиска BLAST нуклеотидной последовательности генома составил 95,92 % с образцом, полученным в Кении в 2018 г. (MN689459.1).

Для филогенетического анализа были использованы 363 нуклеотидные последовательности тройного блока генов TGBp1-3: 267 последовательностей, полученных из NCBI Nucleotide, 95 последовательностей, полученных в результате сборки из публичных образцов колорадского жука, и образец Potato virus S isolate CPB3. Выбор этой последовательности для построения филогении был обусловлен функциональным потенциалом. TGB отвечает за перемещение и транслокацию вирусов. Последовательности PVS кластеризовались в пределах глобально распространенной филогруппы PVS^{I}, что указывает на то, что они являются типичными штаммами PVS, а не сильно дивергентным вариантом.

Эти результаты демонстрируют широкое присутствие генетического материала PVS в колорадском жуке. Учитывая, что новые варианты PVS демонстрируют повышенную трансмиссивность и патогенность, PVS можно считать недооцененным патогеном картофеля, поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить, может ли колорадский жук играть роль в передаче PVS.

Литература

1. Ristić D. et al. The Incidence and Genetic Diversity of Potato virus S in Serbian Seed Potato Crops // Potato Res. 2019. Vol. 62, No. 1. P. 31–46.

2. Topkaya Ş. et al. Molecular Analysis of the Global Population of Potato Virus S Redefines Its Phylogeny, and Has Crop Biosecurity Implications // Viruses. 2023. Vol. 15, No. 5. P. 1104.

3. Franc G. D., Banttari E. E. Mechanically Transmissable Viruses of Potato // Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. P. 159–175.

4. Wardrop E. A. et al. Aphid transmission of potato virus S // Am. Potato J. 1989. Vol. 66, No. 8. P. 449–459.

5. Wielkopolan B., Jakubowska M., Obrępalska-Stęplowska A. Beetles as Plant Pathogen Vectors // Front. Plant Sci. 2021. Vol. 12.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-191

ОБНАРУЖЕНИЕ НОВОГО ВАРИАНТА ВИРУСА *YEZO* В ТРЕХ ВИДАХ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ПОМОЩИ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ*

DETECTION OF A NOVEL VARIANT OF *YEZO* VIRUS IN THREE SPECIES OF IXODID TICK IN THE TOMSK REGION USING METAGENOMIC SEQUENCING

М. В. Апанасевич[1–3], Н. А. Дубовицкий[1], А. А. Дёрко[1], А. А. Хозяинова[4], А. А. Коханенко[2], Г. Н. Артемов[2], Е. В. Денисов[4,5], А. М. Тарасов[2], В. А. Бурлак[2], А. М. Шестопалов[1], К. А. Шаршов[1,3]

[1]*Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2]*Томский государственный университет*
[3]*Новосибирский государственный университет*
[4]*НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН РАН*
[5]*НИИ молекулярной и клеточной медицины медицинского института РУДН, Москва*

M. V. Apanasevich[1–3], N. A. Dubovitskiy[1], A. A. Derko[1], A. A. Khozyainova[4], A. A. Kokhanenko[2], G. N. Artemov[2], E. V. Denisov[4,5], A. M. Tarasov[2], V. A. Burlak[2], A. M. Shestopalov[1], K. A. Sharshov[1,3]

[1]*Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Tomsk State University*
[3]*Novosibirsk State University*
[4]*Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS*
[5]*Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN Medical Institute, Moscow*

✉ apanasevich_mv@mail.ru

Аннотация

Вирус *Yezo* (*Orthonairovirus yezoense*) — вид, впервые идентифицированный в Японии у людей с симптомами лихорадки. Используя метагеномное секвенирование, мы обнаружили наличие полных сегментов и фрагментов генома нового варианта вируса *Yezo* в пулах трех видов иксодовых клещей в Томской области. Результаты исследования подчеркивают важность мониторинга вирусных инфекций с помощью методов метагеномного секвенирования.

Abstract

Yezo virus (*Orthonairovirus yezoense*) is a species first identified in Japan in humans presenting with febrile illness. Using metagenomic sequencing, we detected complete genome segments and fragments of a novel variant of *Yezo* virus in pools of three ixodid tick species from the Tomsk region. The results highlight the importance of monitoring viral infections using metagenomic sequencing approaches.

Клещи являются важными переносчиками различных патогенных микроорганизмов. На территории Томской области эпидемиологическое значение имеют три вида иксодовых клещей: *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes pavlovskyi* и *Ixodes persulcatus*. Все они в разной степени ответственны за распространение как хорошо известных, так и относительно «новых» патогенов. Одним из таких является вирус *Yezo* — новый представитель рода *Orthonairovirus* порядка *Bunyavirales*. Он был впервые выявлен в Японии на острове Хоккайдо в 2019 г. у людей с симптомами лихорадки после укуса клещей [1]. Геном представлен линейной молекулой (-)РНК, состоит из трех сегментов и имеет размер около 18 тыс. нукл. Клинические проявления сопровождаются повышением температуры тела, изменением показателей форменных элементов крови и печеночных ферментов. Обнаружение ранее неизвестных вирусов в популяциях иксодовых клещей свидетельствует о том, что спектр переносимых ими патогенов далек от полного понимания. В настоящей работе мы впервые на территории Западной Сибири обнаружили вирусы вида *Orthonairovirus yezoense* в виромах взрослых самок трех видов иксодовых клещей и провели геномную характеристику обнаруженного полного генома.

Для проведения исследования самки иксодовых клещей были отловлены на территории лесопарковой зоны стадиона «Политехник» в Томске и в окрестностях г. Колпашево. Всего было собрано 13 особей *D. reticulatus*,

* Исследование выполнено в рамках темы научно-исследовательской работы № 225020408196-1.

© М. В. Апанасевич, Н. А. Дубовицкий, А. А. Дёрко, А. А. Хозяинова, А. А. Коханенко, Г. Н. Артемов, Е. В. Денисов, А. М. Тарасов, В. А. Бурлак, А. М. Шестопалов, К. А. Шаршов, 2025

32 особи *I. pavlovskyi* и 24 особи *I. persulcatus*. Далее из образцов подготовили пулы в соответствии с видом и местом сбора и провели обогащение проб вирусоподобными частицами по протоколу NetoVir. Всего подготовили 7 пулов виромных библиотек. Секвенирование выполнили на платформе GenoLab M (GeneMind, Китай) с получением прочтений 2 × 150 нукл. Полученные сырые прочтения обработали при помощи пайплайна ViPER. Концы контигов, содержащие технические последовательности, исключили из итоговой последовательности. Для анализа последовательностей использовали программы Geneious, Expasy, InterProScan, DeepTMHMM, ProP, SignalP, NetNGlyc и NetOGlyc. Схему организации генома подготовили при помощи онлайн-редактора BioRender. Множественное выравнивание последовательностей провели с помощью онлайн-сервера MAFFT. Филогенетические деревья построили с помощью IQ-TREE с использованием ModelFinder для выбора наилучшей модели с бутстреп-тестом 1000 повторений.

Полные сегменты и фрагменты генома вируса были обнаружены в виромных библиотеках всех трех исследованных видов иксодовых клещей. По результатам анализа полного генома пула T30T31 образцов от вида *I. pavlovskyi* было установлено, что сегмент L имеет длину 12 103 нукл. и кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (3938 а. о.), которая содержит опухолеподобный домен протеазы яичников, полимеразный модуль, состоящий из премотива A и мотивов A–E, а также четыре консервативные области I–IV. Сегмент M имеет длину 4247 нукл. и кодирует гликопротеин (1356 а. о.), состоящий из двух субъединиц — Gn и Gc. Было предсказано положение N-концевого сигнального пептида вместе с сайтом его расщепления между 21-й и 22-й а. о. В N-концевой части гликопротеина были обнаружены богатые области O- и N-гликозилирования, подвергающиеся протеолитическому расщеплению. Кроме того, нуклеопротеин вируса *Yezo* обладает консервативными областями петель слияния, как и другие ортонайровирусы. Сегмент S имеет длину 1685 нукл. и кодирует нуклеокапсидный белок (502 а. о.).

По результатам филогенетического анализа по L- и S-сегментам обнаруженный вирус формирует сестринскую кладу по отношению к ранее выявленным вирусам *Yezo*. Нуклеотидная идентичность выявленного вируса по отношению к другим изолятам по L-сегменту составляет 91,08–91,66 %, по M-сегменту — 89,55–90,42 % и по S-сегменту — 91,32–92,27 %. Аминокислотная идентичность по РНК-зависимой РНК-полимеразе составляет 97,60–98,95 %, по гликопротеину — 93,71–94,75 % и по нуклеопротеину — 96,59–97,39 %. В итоге относительно высокий процент отличий сегментов генома этого вируса и результаты филогенетического анализа указывают на обнаружение нового генетического варианта.

Таким образом, использование метагеномного подхода позволило получить полные сегменты генома нового варианта вируса *Yezo*, а также установить то, что три вида иксодовых клещей являются носителями этого вируса на территории Томской области. Оценка их роли в распространении этого вируса на территории Томской области является целью следующих исследований.

Литература

1. Kodama F., Yamaguchi H., Park E. et al. A novel nairovirus associated with acute febrile illness in Hokkaido, Japan // Nat. Commun. 2021. Vol. 12 (1). P. 5539.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-192

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН *

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN THE REPUBLIC OF DAGESTAN

Д. А. Бабошко[1], А. В. Тотменин[1], М. Г. Даудова[2], К. А. Елфимов[1], П. Ю. Ачигечева[1], Д. К. Дандамаев[2], И. П. Осипова[1], Х. Г. Койчуев[2], Х. Ф.-К. Гапизова[2], Л. Г. Готфрид[1], З. Р. Шахбанова[2], Н. М. Гашникова[1]

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

D. A. Baboshko[1], A. V. Totmenin[1], M. G. Daudova[2], K. A. Elfimov[1], P. Y. Achigecheva[1], D. K. Dandamaev[2], I. P. Osipova[1], K. G. Koychuev[2], K. F.-K. Gapizova[2], L. G. Gotfrid[1], Z. R. Shakhbanova[2], N. M. Gashnikova[1]

[1]State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
[2]Dagestan State University, Makhachkala

✉ d.baboshko@g.nsu.ru

Аннотация

Молекулярно-филогенетическое исследование ВЛКРС в Республике Дагестан включало ПЦР-диагностику 362 проб и анализ гена *env*. Общая пораженность составила 28,7 %. Выявлено преобладание генотипа G4 (≈ 80 %) над G7 (≈ 19 %). Последовательности G7 ВЛКРС образовали кластеры, указывающие на локальную передачу, последовательности G4 отличились большей генетической гетерогенностью и кластеризацией с последовательностями из Казахстана и Ростова-на-Дону.

Abstract

The molecular phylogenetic study of BLV (Bovine Leukemia Virus) in the Republic of Dagestan included PCR diagnostics of 362 samples and analysis of the env gene. The overall prevalence was 28.7 %. A predominance of genotype G4 (≈ 80 %) over G7 (≈ 19 %) was detected. The G7 BLV sequences formed clusters indicating local transmission, while the G4 sequences showed greater genetic heterogeneity and clustering with sequences from Kazakhstan and Rostov-on-Don.

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) — это представитель рода дельтаретровирусов семейства ретровирусов, вызывающий энзоотический лейкоз крупного рогатого скота, который приводит к раковым заболеваниям и снижению продуктивности животного. Большинство инфицированных животных остаются бессимптомными носителями; лимфосаркома наблюдается только у 5 % инфицированных животных, однако около 30 % демонстрируют стойкий лимфоцитоз [1].

Штаммы ВЛКРС дифференцируются на 12 генотипов (G1-G12), при этом филогенетический анализ зачастую проводят по нуклеотидным последовательностям гена *env* [2].

Распространенность ВЛКРС может сильно различаться в зависимости от региона мира и отдельной страны. Например, страны Западной Европы рапортуют о практически полном искоренении ВЛКРС на своей территории за счет противоэпидемических мероприятий, а в Северной Америке, напротив, сохраняется высокая распространенность вируса (≈ 80 %) [3]. Для улучшения эпизоотической ситуации в России требуются новые исследования, посвященные диагностике и эпидемиологическому анализу ВЛКРС в разных регионах страны.

Материалы и методы

В исследовании использовалась геномная ДНК лейкоцитов периферической крови 362 голов молочного и мясного КРС из семи районов Республики Дагестан (РД) (рис. 1). Для диагностики ВЛКРС использовалась коммерческая тест-система на основе ПЦР-РВ РеалБест-Вет ДНК BLV («Вектор-Бест», Россия).

Для генотипирования и филогенетического анализа использовались последовательности генома ВЛКРС, кодирующие фрагмент гена *env*.

Филогенетический анализ проводился с использованием ПО MEGA6 методом присоединения ближайших соседей, основанным на двухпараметрической модели Кимуры, и с помощью веб-утилиты IQTree v1.6.12 методом максимального правдоподобия. Статистическая значимость топологии филогенетических деревьев оценива-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 4/21).

© Д. А. Бабошко, А. В. Тотменин, М. Г. Даудова, К. А. Елфимов, П. Ю. Ачигечева, Д. К. Дандамаев, И. П. Осипова, Х. Г. Койчуев, Х. Ф.-К. Гапизова, Л. Г. Готфрид, З. Р. Шахбанова, Н. М. Гашникова, 2025

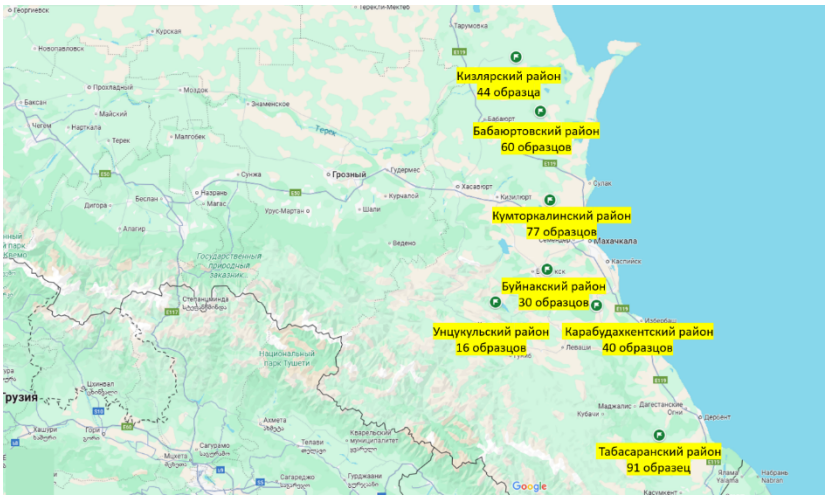


Рис. 1. Географическое расположение мест отбора проб в Республике Дагестан

лась с помощью бутстреп-анализа (n = 1000). Индексы идентичности нуклеотидных последовательностей были получены с помощью ПО SDTv1.2. Для получение аминокислотных последовательностей и их множественных выравниваний применялось ПО Geneious Pro 5.3.

Результаты

Разные районы РД сильно отличались по распространенности ВЛКРС. Так, в Унцукульском районе не было обнаружено ни одной инфицированной особи, в Буйнакском, Карабудахкентском и Табасаранском районах доля ВЛКРС-положительных особей КРС была крайне низкой (3,3; 5 и 3,3 % соответственно). Бабаюртовский район, напротив, отмечался высоким распространением ВЛКРС в стадах — 35 %.

После первичной диагностики ВЛКРС-положительные пробы использовались для секвенирования гена *env* ВЛКРС, генотипирования вирусов и филогенетического анализа (рис. 2).

Филогенетическое дерево показало, что большинство вариантов G7 образуют монофилетические кластеры. Это указывает на межхозяйственное распространение G7 ВЛКРС в пределах одного района (см. рис. 2, *а*). С другой стороны, G4 ВЛКРС в РД представляет более гетерогенную популяцию: некоторые последовательности гена *env* G4 группируются с последовательностями из Казахстана (см. рис. 2, *б*), в то время как другие — с секвенированными фрагментами гена *env* из Ростова-на-Дону в России (см. рис. 2, *в*). Стоит отметить, что случаи поражения молодняка и структурность кластеров близких вирусов подтверждают, что новые вспышки ВЛКРС

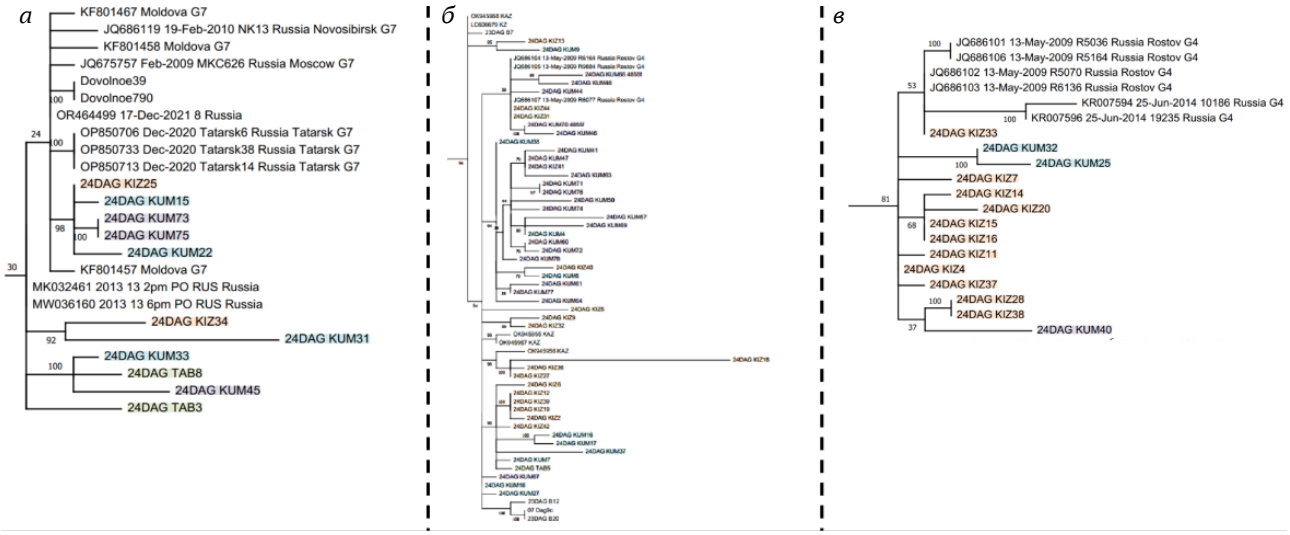


Рис. 2. Фрагменты филогенетического дерева, построенного для области *env* исследованных вариантов ВЛКРС из РД: *а* — фрагмент дерева для G7 ВЛКС; *б* — фрагмент дерева для G4 ВЛКРС, имеющих близкое происхождение с G4 из Казахстана; *в* — фрагмент дерева для G4 ВЛКРС, имеющих близкое происхождение с G4 из Ростова-на-Дону

в основном обусловлены передачей инфекции внутри региона, а не ввозом из других мест. Однако корреляции между количеством инфицированных животных, породой и возрастом найдено не было.

Заключение

Изучение ВЛКРС в РД показало выраженную неравномерность его распространения: в одних районах вирус практически не выявляется (0–3,3 %), тогда как в Бабаюртовском районе доля инфицированных животных была велика — 35 %. При этом не установлено корреляции между наличием ВЛКРС и породой или возрастом КРС. Молекулярно-генетический анализ показал циркуляцию двух основных генотипов вируса: G4 и G7. Штаммы G7 образуют генетически однородные кластеры, отражающие локальные цепочки передачи, тогда как некоторые последовательности *env* генотипа G4 кластеризуются с последовательностями из Казахстана и Ростова-на-Дону.

Литература

1. Mousavi S. et al. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran // Veterinary Res. Forum: Int. Q. J. 2014. Vol. 5, No. 2. P. 135.

2. Rola-Łuszczak M. et al. Molecular characterization of the env gene of bovine leukemia virus in cattle from Pakistan with NGS-based evidence of virus heterogeneity // Pathogens. 2021. Vol. 10, No. 7. P. 910.

3. Lv G. et al. The global epidemiology of bovine leukemia virus: current trends and future implications // Animals. 2024. Vol. 14, No. 2. P. 297.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-193

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ АДЕНОВИРУСОВ И ИХ СЕРОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ У ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМИ ОРЗ В ТАШКЕНТЕ (УЗБЕКИСТАН) В 2024 ГОДУ *

PREVALENCE OF ADENOVIRUSES AND THEIR SEROTYPIC DIVERSITY IN PATIENTS WITH SEVERE ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS IN TASHKENT (UZBEKISTAN) IN 2024

С. Б. Бердиева[1,4], Д. С. Демина[1], И. Д. Осипов[1], Д. Е. Маслов[1], В. А. Васиховская[1], Д. С. Забелина[1], Э. И. Мусабаев[2], Д. Ш. Кушакова[2], Э. Ф. Аглетдинов[3], С. В. Нетёсов[1]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*НИИ вирусологии, Ташкент*
[3]*АО «Вектор-Бест», Новосибирск*
[4]*Ургенчский государственный университет им. Абу Райхана Беруни, Узбекистан*

S. B. Berdieva[1,4], D. S. Demina[1], I. D. Osipov[1], D. E. Maslov[1], V. A. Vasikhovskaya[1], D. S. Zabelina[1], E. I. Musabaev[2], D. Sh. Kushakova[2], E. F. Agletdinov[3], S. V. Netesov[1]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Research Institute of Virology, Tashkent*
[3]*Vector-Best JSC, Novosibirsk*
[4]*Urgench State University named after Abu Rayhan Beruni, Uzbekistan*

✉ berdiyevasaboxat@gmail.com, d.demina@g.nsu.ru

Аннотация

В 2024 г. нами были проанализированы 2636 ротоглоточных мазков (1503 у детей, 1133 у взрослых) из четырех медучреждений Ташкента Республики Узбекистан. Аденовирусную ДНК выявляли с помощью ПЦР в реальном времени; серотип определяли секвенированием по Сэнгеру вариабельного района гена гексона. Аденовирусы обнаружены в 243 образцах: у детей — 129/1503 (8,6 %), у взрослых — 114/1133 (10,1 %). У детей чаще выявлялись серотипы C1, B55, C5, C6 и B7, у взрослых — C6, C1 и B55.

Abstract

In 2024, we analyzed 2,636 oropharyngeal swabs (1,503 from children and 1,133 from adults) collected from four medical institutions in Tashkent, Republic of Uzbekistan. Adenoviral DNA was detected using real-time PCR, and serotypes were determined by Sanger sequencing of the hypervariable region of the hexon gene. Adenoviruses were detected in 243 samples: 129 out of 1,503 (8.6 %) in children and 114 out of 1,133 (10.1 %) in adults. Among children, the most frequently identified serotypes were C1, B55, C5, C6, and B7; among adults — C6, C1, and B55.

Аденовирусы человека (HAdV) являются безоболочечными вирусами с двухцепочечной линейной ДНК и относятся к роду *Mastadenovirus* семейства *Adenoviridae* [1]. Существует 7 видов аденовирусов человека, включающих 56 серотипов, при этом серотипы демонстрируют ограниченную кросс-реактивность. Аденовирусы человека могут вызывать инфекции в любом возрасте, но наиболее часто поражают детей, особенно младенцев. К 10 годам большинство детей переносят по крайней мере один эпизод аденовирусной инфекции. Клинические проявления включают следующие симптомы: риниты, ринорею, лихорадку, кашель и боль в горле. Возможны тяжелые формы ОРЗ: бронхит, бронхиолит и пневмония. Также аденовирусы могут вызывать конъюнктивит, гастроэнтерит, геморрагический цистит и менингоэнцефалит [2].

Мы провели исследование распространенности аденовирусных инфекций и разнообразия представленных серотипов у пациентов с острыми респираторными заболеваниями в Ташкенте (Республика Узбекистан). Пробы собирали в 2024 г. в 4 медицинских учреждениях города — в Городской детской клинической больнице № 5 Ташкента, в Республиканской специализированной больнице № 1 Зангиоты, в Инфекционной больнице для пациентов COVID-19 № 2 Зангиоты, в Центральной поликлинике Алмазорского районного медицинского объединения. Всего было собрано 2636 ротоглоточных мазков: 1503 у пациентов в возрасте до 18 лет (дети) и 1133 у пациентов старше 18 лет (взрослые).

* Исследование выполнено за счет финансирования Новосибирского государственного университета по государственным заданиям Министерства науки и высшего образования РФ (FSUS-2025-0012 и FSUS-2025-0017).

© С. Б. Бердиева, Д. С. Демина, И. Д. Осипов, Д. Е. Маслов, В. А. Васиховская, Д. С. Забелина, Э. И. Мусабаев, Д. Ш. Кушакова, Э. Ф. Аглетдинов, С. В. Нетёсов, 2025

Аденовирусную ДНК определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Положительный результат был получен в 243 из 2636 образцов (9,2 %): среди детей — в 129 из 1503 (8,6 %), среди взрослых — в 114 из 1133 (10,1 %). Для определения серотипа амплифицировали участок гена гексона, включающий первую вариабельную петлю с последующим секвенированием по Сенгеру.

Среди 129 детских проб, в которых выявлена ДНК аденовируса наиболее часто встречались серотипы HAdV-C1 (12 проб; 9,3 %), HAdV-B55 (9 проб; 7,0 %), HAdV-C5 (8 проб; 6,2 %), HAdV-C6 (8 проб; 6,2 %) и HAdV-B7 (7 проб; 5,4 %). Максимальный уровень выявления аденовирусов среди детей пришелся на I квартал (январь — март), что, вероятно, связано с сезонным подъемом заболеваемости острыми респираторными инфекциями в холодное время года и повышенной циркуляцией вирусов в детских учреждениях и семьях, особенно среди детей младшего возраста.

Среди 114 положительных проб, полученных от взрослых пациентов, наибольшее число случаев пришлось на серотипы HAdV-C6 (23 образца; 20,2 %) и HAdV-C1 (20 образцов; 17,5 %). Также были выявлены HAdV-B55 (14 проб; 12,3 %), HAdV-C2 (7 проб; 6,1 %) и HAdV-B7 (6 проб; 5,3 %). Особый интерес представляет высокая доля HAdV-C6, что до сих пор было нехарактерно для взрослого населения крупных городов. Кроме того, отмечена циркуляция высокопатогенного серотипа HAdV-B55. Пик выявления аденовирусной инфекции у взрослых пришелся на III квартал (июль — сентябрь), вероятно, в связи с климатическими условиями и повышенной социальной активностью в период начала занятий в школах и детских дошкольных учреждениях в теплое время года.

Полученные данные за 2024 г. свидетельствуют о циркуляции различных серотипов аденовирусов групп B и C среди населения Ташкента. Особое внимание привлекает высокая распространенность HAdV-C6 среди взрослых, что не является типичным, а также выявление HAdV-B55, ассоциированного ранее в других странах с тяжелыми клиническими формами инфекции. Результаты исследования подчеркивают полезность регулярного молекулярного мониторинга за аденовирусной инфекцией в городской популяции. Полученные данные позволяют выявить серотипы, для которых разработка вакцин является наиболее важной. Это позволит снизить число тяжелых случаев и уменьшить нагрузку на систему здравоохранения.

Литература

1. Международный комитет по таксономии вирусов семейства Adenoviridae. URL: https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Adenoviridae (дата обращения: 23.07.2025).

2. Wun-Ju Shieh Human adenovirus infections in pediatric population — An update on clinico-pathologic correlation // Biomed. J. 2022 Feb. Vol. 45 (1). P. 38–49.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-194

ПЕРСИСТЕНЦИЯ ШТАММОВ ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO

PUUMALA HANTAVIRUS STRAINS PERSISTENCE IN VERO CELL CULTURE

А. Н. Ветрова, С. С. Курашова, М. С. Егорова, Т. К. Дзагурова

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

A. N. Vetrova, S. S. Kurashova, M. S. Egorova, T. K. Dzagurova

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

✉ ann.vetr.99@mail.ru

Аннотация

Хантавирусы вызывают хроническую инфекцию у резервуарного хозяина, не влияющую на его жизнедеятельность. Представляет интерес изучение персистенции хантавирусов в культурах клеток. Проведено сравнение хронической инфекции культуры Vero штаммами хантавируса Пуумала, отличающимися по числу пассажей. Наблюдалась цикличность накопления РНК вируса в культуральной жидкости (КЖ) и клетках с более высоким уровнем РНК для штамма, прошедшего меньше пассажей.

Abstract

Hantaviruses cause a chronic infection of the natural host. It is of interest to study the hantavirus persistence in cell culture. We compared chronic infection of Vero cell culture with Puumala virus strains isolated from HFRS patients and differing in the number of passages in Vero cells. We observed a cyclical accumulation of viral RNA for both strains. The strain that had passed through fewer passages had a higher level of RNA accumulation.

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая ортохантавирусом Пуумала, занимает ведущее место среди природно-очаговых инфекций на территории РФ. На сегодняшний день остаются мало изученными многие аспекты взаимодействия ортохантавирусов с клетками как их естественных хозяев (*Rodentia*), так и человека.

Известно, что хантавирус Пуумала, адаптированный к клеточной культуре Vero, не является цитолитическим, что позволяет осуществлять длительное пассирование зараженной культуры. Целью исследования было определение продолжительности персистенции хантавируса Пуумала, представленного двумя изолятами от больных ГЛПС, прошедшими более 90 пассажей (Пуумала-ТКД) и 2 пассажа (Пуумала-Ж) в культуре Vero.

Материалы и методы

Культивирование штаммов вируса Пуумала проводили в культуре клеток Vero. Множественность заражения для обоих штаммов исходно была одинаковой. Зараженную культуру клеток, пассировали раз в неделю без добавления чистых клеток. На 7-е сутки из флаконов отбирались пробы КЖ и клеточной взвеси, в которых определяли количество вирусной РНК при помощи метода ОТ-ПЦР-РВ, и определяли наличие вирусного антигена в клетках методом флуоресцирующих антител (МФА).

Результаты

Культура клеток в зараженных и контрольных флаконах была пассирована более 20 раз. Наблюдалась волнообразная динамика количества вирусной РНК как в КЖ, так и в клетках. После первых двух пассажей, в которых количество РНК в клетках нарастало (для Пуумала-ТКД — до 7,5 lg, для Пуумала-Ж — до 8,9 lg), на протяжении следующих нескольких пассажей количество РНК снижалось, достигая в минимуме 5,0 lg для Пуумала-ТКД и 7,6 lg для Пуумала-Ж. Далее количество РНК возрастало, достигнув на 9 пассаже 6,9 lg для Пуумала-ТКД и 10,1 lg для Пуумала-Ж. В последующих пассажах пиковые значения количества РНК сменялись минимальными каждые 1–2 пассажа, разница между максимальными и минимальными показателями составляла до 4 lg. В пробах КЖ наблюдались колебания количества вирусной РНК, соответствующие подъемам и спадам РНК в клетках, но количество РНК в КЖ стабильно было ниже на 2,1–3,3 lg, что соответствует данным, полученным нами ранее.

© А. Н. Ветрова, С. С. Курашова, М. С. Егорова, Т. К. Дзагурова, 2025

Количество вирусной РНК в пробах Пуумала-Ж было стабильно выше на 1,1–2,4 lg, чем в пробах Пуумала-ТКД тех же пассажей. Объяснение этого феномена может быть связано с различными причинами, включая биологические свойства штаммов, разницу в исходном количестве их пассажей в культуре, возможное накопление пустых вирусных частиц в результате длительного пассирования.

Периоды максимального и минимального накопления РНК для штаммов Пуумала-ТКД и Пуумала-Ж совпадали: максимальные показатели наблюдались на 9, 14, 16, 18, 21 пассажах, а минимальные — на 5, 11, 15, 17 и 19 пассажах.

Количество вирусного антигена в зараженных клетках колебалось от 30 до 100 %. Корреляции этих колебаний с изменением количества вирусной РНК в клетках не выявлено.

Заключение

Многократное пассирование зараженной хантавирусом Пуумала культуры Vero без добавления незараженных клеток продемонстрировало персистенцию вируса в клетках на протяжении 20 пассажей и цикличность его репродукции. Несмотря на то что культура Vero является иммунодефицитной по интерфероновому ответу, выявленные колебания количества вирусной РНК в клетках могут свидетельствовать о периодической активации других механизмов подавления вирусной репликации. Динамика количества РНК в пробах КЖ и клеток оказалась схожей для обоих штаммов хантавируса Пуумала. Для штамма, исходно прошедшего меньшее количество пассажей, характерен был более высокий уровень накопления вирусной РНК.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-195

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

WHOLE-GENOME ANALYSIS OF HEPATITIS C VIRUS GENETIC VARIABILITY IN THE RUSSIAN POPULATION

А. Г. Глущенко[1,2], М. Д. Чанышев[1], А. С. Чернышова[1,2], А. А. Гришаева[1], В. В. Макашова[1], К. Ф. Хафизов[1]

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

A. G. Glushchenko[1,2], M. D. Chanyshev[1], A. S. Chernyshova[1 2], A. A. Grishaeva[1], V. V. Makashova[1], K. F. Khafizov[1]

[1] *Central Research Institute of Epidemiology, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ albinagluschenko@gmail.com

Аннотация

Проведено полногеномное секвенирование вируса гепатита С в российской популяции с последующим анализом синонимичных и несинонимичных замен, что позволило выявить участки позитивного отбора и подчеркивает необходимость дальнейшего мониторинга для понимания адаптационной изменчивости вируса.

Abstract

Whole-genome sequencing of hepatitis C virus in the Russian population was performed, followed by analysis of synonymous and nonsynonymous substitutions, which allowed the identification of sites under positive selection and emphasizes the need for ongoing monitoring to understand the adaptive variability of the virus.

Гепатит С, заболевание печени, вызываемое вирусом гепатита С (ВГС), является глобальной проблемой общественного здравоохранения. В России по состоянию на 2020 г. проживало 24,5 тыс. пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит С», а уровень заболеваемости составил 16,7 тыс. на 100 тыс. человек [1]. Генетическая гетерогенность вируса гепатита С играет критическую роль в развитии хронической инфекции и устойчивости к терапии. В абсолютном большинстве исследований, включающих секвенирование РНК ВГС, определялись только отдельные участки генома, например гены NS3, NS5a или NS5b. Существуют единичные зарубежные работы, в которых геном ВГС был секвенирован полностью. Мы разработали амплификационную панель NGS для полногеномного секвенирования ВГС, которая была использована в настоящей работе.

Цель настоящей работы — изучить генетическую вариабельность штаммов ВГС, циркулирующих в России, на основе данных полногеномного секвенирования.

Для исследования было отобрано 153 образца плазмы от пациентов с хроническим гепатитом С, проживающих на территории Российской Федерации. Пробоподготовка проводилась с помощью разработанной нами амплификационной панели для полногеномного секвенирования ВГС. Панель позволяет амплифицировать перекрывающиеся участки генома ВГС с помощью наборов по 79, 67 или 89 праймеров, применяемых в зависимости от генотипа. Секвенирование выполнялось на платформе Illumina Miseq.

В результате было получено 153 полногеномных последовательности ВГС со средним покрытием 98,4 %. В 93 случаях был представлен генотип 1, в 6 — генотип 2, в 54 — генотип 3.

Образцы генотипов 1 и 3 были проанализированы на соотношение несинонимичных (β) и синонимичных (α) замен с использованием метода FEL в программном пакете HyPhy (рис. 1, 2). Анализ выявил 54 сайта со статистически значимыми признаками позитивного отбора для генотипа 1 и 61 сайт — для генотипа 3 (тест отношения правдоподобия, $p < 0{,}1$). Они преимущественно локализованы в генах E1, E2, NS5a и NS5b, что может указывать на процесс адаптации вируса к иммунному ответу хозяина, а также о формировании устойчивости к противовирусной терапии. Примечательно, что для генотипа 1 два сайта гена NS5b совпадают с участками, ассоциированными с мутациями, вызывающими лекарственную резистентность: V499A [2] и S556G/N/R [3]. В случае генотипа 3 кодон в позиции 62 белка NS5a также соответствует участку мутаций, связанных с резистентностью к даклатасвиру: A62L [3], Q62R/E [2].

© А. Г. Глущенко, М. Д. Чанышев, А. С. Чернышова, А. А. Гришаева, В. В. Макашова, К. Ф. Хафизов, 2025

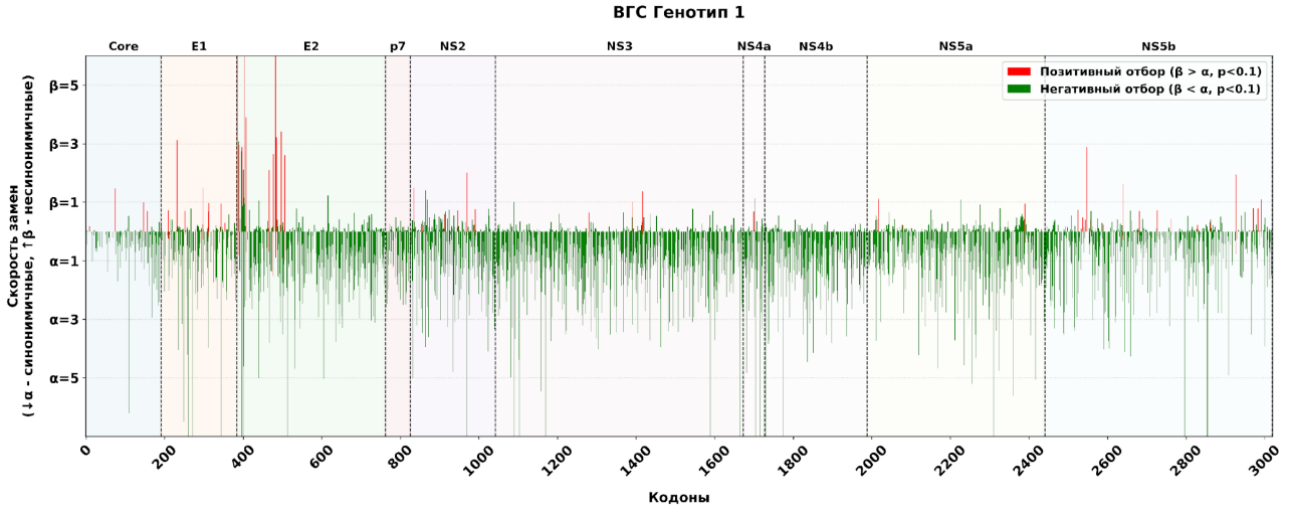


Рис. 1. Оценка скорости синонимичных (α, *вниз*) и несинонимичных (β, *вверх*) замен в геноме HCV генотипа 1. *Красным/зеленым* выделены участки с признаками позитивного/очищающего отбора соответственно (тест отношения правдоподобия, $p < 0{,}1$). *Черные пунктирные линии* обозначают границы генов. Значения вертикальной оси ограничены до 5,5

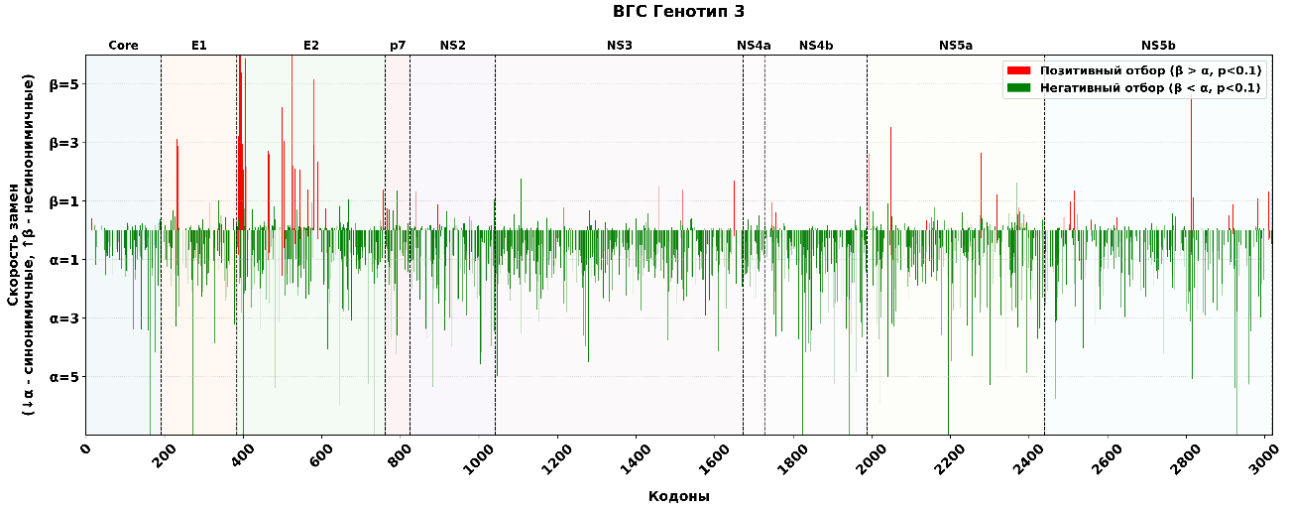


Рис. 2. Оценка скорости синонимичных (α, *вниз*) и несинонимичных (β, *вверх*) замен в геноме HCV генотипа 3. *Красным/зеленым* выделены участки с признаками позитивного/очищающего отбора соответственно (тест отношения правдоподобия, $p < 0{,}1$). *Черные пунктирные линии* обозначают границы генов. Значения вертикальной оси ограничены до 5,5

Исследование демонстрирует высокую адаптивность вируса гепатита С и подтверждает необходимость регулярного мониторинга его генетического разнообразия в России. Выявленные участки положительного отбора, включая зоны, ассоциированные с лекарственной устойчивостью, подчеркивают значимость полногеномного анализа для оптимизации терапии и эпидемиологического надзора. Предложенная методика впервые обеспечивает получение полных геномных данных ВГС в российской популяции, что важно для изучения эволюции вируса и разработки персонализированных подходов к лечению.

Литература

1. Isakov V., Nikityuk D. Elimination of HCV in Russia: Barriers and Perspective // Viruses. 2022. Vol. 14, No. 4. P. 790.

2. Preciado M. V., Valva P., Escobar-Gutierrez A. et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy // World J. Gastroenterol. 2014. Vol. 20, No. 43. P. 15992–16013.

3. Ceccherini-Silberstein F., Cento V., Di Maio V. C. et. al. Viral resistance in HCV infection // Curr. Opin. Virol. 2018. Vol. 32. P. 115–127.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-196

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АДЕНОВИРУСОВ И РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНЫХ ВИРУСОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ ГОРОДСКОЙ ИНФЕКЦИОННОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ № 1 НОВОСИБИРСКА С ДИАГНОЗОМ ОРЗ *

GENETIC DIVERSITY OF ADENOVIRUS SEROTYPES AND RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS AMONG THE PATIENTS OF CITY INFECTIOUS DISEASES HOSPITAL NO. 1 IN NOVOSIBIRSK

Д. С. Демина[1], С. Б. Бердиева[1], И. Д. Осипов[1], Д. Е. Маслов[1], Л. Л. Позднякова[3], Я. С. Ульянова[3], Ю. Е. Томилова[2], Э. Ф. Аглетдинов[2], С. В. Нетесов[1]

[1]Новосибирский государственный университет
[2]АО «Вектор-Бест», Новосибирск
[3]Городская инфекционная клиническая больница № 1, Новосибирск

D. S. Demina[1], S. B. Berdieva[1], I. D. Osipov[1], D. E. Maslov[1], L. L. Pozdnyakova[3], Ya. S. Ulyanova[3], Yu. E. Tomilova[2], E. F. Agletdinov[2], S. V. Netesov[1]

[1]Novosibirsk State University
[2]Vector-Best JSC, Novosibirsk
[3]City Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk

✉ d.demina@g.nsu.ru

Аннотация

Распространенность серотипов аденовирусов и субтипов респираторно-синцитиальных вирусов (РСВ) на территории России мало изучена, хотя эти вирусы способны вызывать ОРЗ с тяжелым течением, вплоть до летального исхода, особенно у детей и пожилых людей. Мы разработали и апробировали систему для генотипирования РСВ. Также мы определили представленность аденовирусов в образцах от пациентов Городской инфекционной клинической больницы № 1 за эпидсезон 2023–2024 гг.

Abstract

The prevalence of adenovirus serotypes and respiratory syncytial virus (RSV) subtypes in Russia is poorly studied, although these viruses can cause acute respiratory infections (ARI) with severe courses, sometimes resulting in fatal outcomes, especially among children and the elderly. We have developed and tested a system for RSV genotyping. Additionally, we determined the presence of adenoviruses in samples from patients at CIDCH No. 1 during the 2023–2024 epidemic season.

Аденовирусы — это семейство ДНК-вирусов, не имеющих липидной оболочки и поражающих различные группы позвоночных. Представители рода *Mastadenovirus* вызывают заболевания у млекопитающих. Среди способных поражать человека аденовирусов выделяют 7 видов, 3 из них (*M. blackbeardi*, *M. caesari* и *M. exoticum*) являются возбудителями ОРЗ, поражающих человека [1, 2].

РСВ — это оболочечный вирус с антисмысловым РНК-геномом из семейства *Pneumoviridae*, вызывающий инфекции дыхательных путей. Особенно опасен для детей до 5 лет и пожилых людей [3, 4].

Мы провели сбор образцов от пациентов Городской инфекционной клинической больницы № 1 (ГИКБ № 1) за эпидсезон 2023–2024 гг. Все работы проводились в соответствии с одобренными этическими комиссиями ГИКБ № 1 процедурами. Всего было собрано 1609 образцов, из которых 43 (2,7 %) содержали ДНК аденовирусов. Определение серотипов аденовирусов из материала проводилось с помощью разработанной ранее системы методом секвенирования вариабельного района гена поверхностного белка гексона. Подробные результаты определения серотипов представлены в таблице. Подавляющее большинство проанализированных проб относится к виду *M. blackbeardi*, который вызывает гораздо более тяжелое течение ОРЗ, нежели вид *M. caesari* [5].

В предыдущей работе этим же методом мы определили серотипы аденовирусов в образцах от пациентов Детской городской клинической больницы № 3 (ДГКБ № 3) 2021–2023 гг. Выявлено преобладание серотипов аденовирусов 1, 2, 3 и 7 (составили примерно 80 % всех диагностированных случаев аденовирусной инфекции). Это соответствует мировой тенденции: указанные серотипы чаще ассоциируются с острыми респираторными заболеваниями у детей.

* Исследование выполнено за счет финансирования Новосибирского государственного университета по государственным заданиям Министерства науки и высшего образования РФ (FSUS-2025-0012 и FSUS-2025-0017).

© Д. С. Демина, С. Б. Бердиева, И. Д. Осипов, Д. Е. Маслов, Л. Л. Позднякова, Я. С. Ульянова, Ю. Е. Томилова, Э. Ф. Аглетдинов, С. В. Нетесов, 2025

Количественное распределение серотипов аденовирусов человека в проанализированных пробах

Вид аденовируса	Серотип аденовируса	Количество проб от пациентов ГИКБ № 1	Доля, %	Количество проб от пациентов ДГКБ № 3	Доля, %
Вид B	3	8	30,8	11	20
	7	4	15,4	11	20
	55	13		1	1,8
	Не определен			1	1,8
Вид C	1			9	16,4
	2	1	3,8	13	23,6
	5			4	7,3
	6			1	1,8
	Не определен			1	1,8
Вид E	4			3	5,5

Параллельно были разработаны и внедрены методы типирования РСВ. Для определения субтипа применяли модифицированный ОТ-ПЦР тест (РеалБест-ОРВИ РНК hRSV/hPIV4), который выявляет РНК обоих субтипов, и субтипоспецифичные зонды. В 41 из 61 пробы удалось определить субтипы РСВ: 16 относились к субтипу А (39 %) и 25 — к В (61 %).

Для определения генотипа РСВ использовалась система, включающая амплификацию фрагмента гена G-белка при помощи вложенной ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру (см. рисунок). При этом возможно применение универсальных для обоих субтипов ПЦР смесей на каждом из этапов.

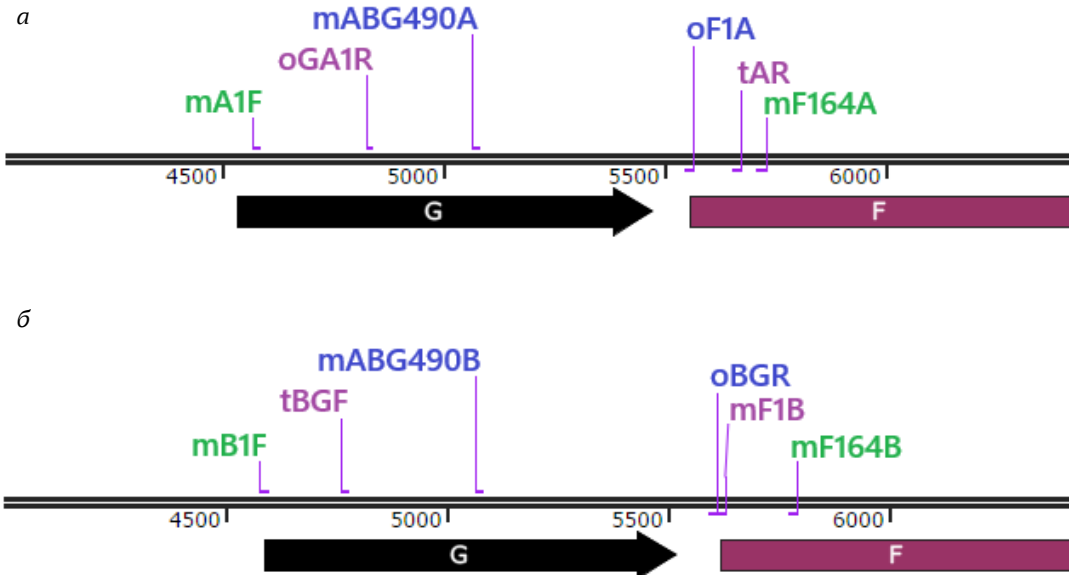


Схема отжига праймеров для определения генотипа РСВ. *Зеленым цветом* обозначены праймеры 1-й ПЦР, *фиолетовым* — 2-й ПЦР, *синим* — секвенирующие: *а* — положение праймеров на геноме РСВ субтипа А; *б* — субтипа В

Апробация системы генотипирования на образцах, полученных в ГИКБ № 1, выявила присутствие 5 космополитных генотипов РСВ (3 для субтипа А и 2 — В).

На основании полученных данных можно разрабатывать более простые методы определения распространенных вариантов аденовирусов и РСВ, особенно тех, которые вызывают тяжелые случаи ОРЗ.

Выводы

1. Разработана генотипирующая система для РСВ, включающая 2 раунда ПЦР с универсальными наборами праймеров с последующим секвенированием.

2. Установлен вклад РСВ в этиологию тяжелых респираторных заболеваний среди взрослых (3,8 %). В эпидсезоне 2023–2024 гг. наиболее представлен субтип В.

3. Установлен вклад аденовирусов в этиологию тяжелых респираторных заболеваний среди взрослых (2,7 %). У взрослых основными серотипами выявленных аденовирусов являются 3; 7 и 55 (вид B).

4. Целесообразно продолжить исследования, направленные на оценку и обоснование разработки вакцин против 3 указанных серотипов аденовирусов, а также против РСВ субтипа B.

Литература

1. Adenoviridae | ICTV. URL: https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae (accessed: 28.07.2025).

2. Wang Y. F. et al. Molecular epidemiology and clinical manifestations of adenovirus respiratory infections in taiwanese children // Medicine (United States). Lippincott Williams and Wilkins, 2016. Vol. 95, No. 18. P. e3577.

3. Falsey A. R., Walsh E. E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults // Clin. Microbiol. Rev. 2000. Vol. 13. URL: https://doi.org/10.1128/cmr.13.3.371. (accessed: 28.07.2025).

4. Alfano F., Bigoni T., Caggiano F. P., Papi A. Respiratory Syncytial Virus Infection in Older Adults: An Update // Drugs Aging. 2024. Vol. 41 (6). P. 487–505.

5. Агеева М. Р., Яцышина С. Б. Недооцененная инфекция — к вопросу о факторах патогенности аденовирусов человека // Вопр. вирусологии. 2019. Т. 64 (2). С. 53–62.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-197

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТРАНСГЕНЫ АПОПТИНА И СИМПОРТЕРА НАТРИЯ/ЙОДИДА, ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ*

INVESTIGATION OF RECOMBINANT VACCINE VIRUSES EXPRESSING APOPTIN AND SODIUM/IODIDE IMPORTER TRANSGENES FOR TUMOR THERANOSTICS USING SYNCHROTRON RADIATION

Д. В. Дроков[1,2], К. А. Лапшин[2–4], А. В. Семенова[1], А. А. Гражданцева[1], А. А. Легкодымов[3,4], Г. В. Кочнева[1]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2]*Новосибирский государственный университет*
[3]*Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН, Новосибирск*
[4]*ЦКП «СКИФ» Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН, р. п. Кольцово*

D. V. Drokov[1,2], K. A. Lapshin[2–4], A. V. Semenova[1], A. A. Grazhdantseva[1], A. A. Legkodymov[3,4], G. V. Kochneva[1]

[1]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2]*Novosibirsk State University*
[3]*Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk*
[4]*Synchrotron Radiation Facility — Siberian Circular Photon Source "SKIF", Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Koltsovo*

✉ d.drokov@g.nsu.ru

Аннотация

Вирус осповакцины (VACV) обладает природными противоопухолевыми свойствами, что делает его перспективным агентом для онколитической виротерапии. В настоящей работе была произведена оценка цитотоксической и йод-аккумулирующей активности двойных рекомбинантных штаммов вируса осповакцины VV-mNIS-Apo и VV-P11mNIS-Apo в отношении опухолевых клеток человека.

Abstract

Vaccinia virus (VACV) has natural antitumor properties, which makes it a promising agent for oncolytic virotherapy. In this work, the cytotoxic and iodine-accumulating activity of double recombinant strains of the vaccinia virus VV-mNIS-Apo and VV-P11mNIS-Apo against human tumor cells was evaluated.

Создание препаратов, которые одновременно можно использовать и в ранней диагностике, и в терапии, — новый подход в фармацевтике, получивший название «тераностика» (англ. *theranostics*). Тераностика — это наиболее эффективный путь для лечения многих заболеваний, в том числе онкологических. Стратегия этого подхода состоит в том, чтобы сначала диагностировать мишень, а потом этим же «инструментом» ее поразить. На роль такого инструмента в случае онкологии идеально подходят онколитические вирусы, которые способны адресно распознавать и «убивать» (лизировать) раковые клетки.

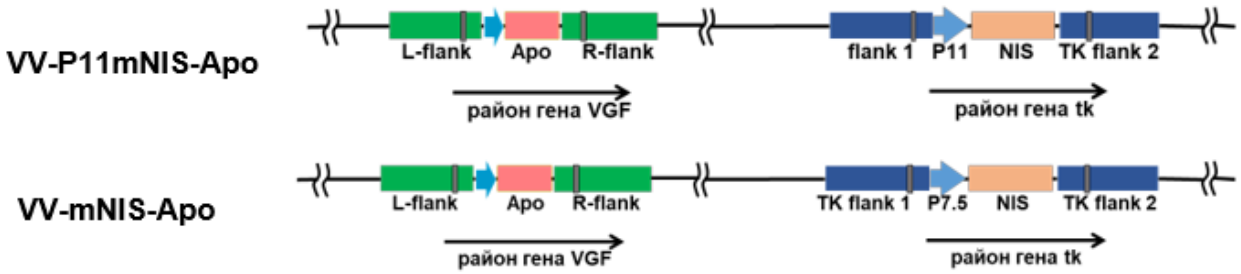
Вирус осповакцины (VACV) — генетически стабильный, хорошо изученный вирус, обладает рядом особенностей, которые делают его одним из фаворитов в разработках противоопухолевых препаратов на основе онколитических вирусов [1]. На его основе получен целый ряд рекомбинантных штаммов, одновременно несущих в геноме инсерции трансгенов онкотоксических и репортерных белков.

В настоящей работе использовано два рекомбинантных варианта VACV: VV-mNIS-Apo и VV-P11mNIS-Apo, несущие трансгены репортерного гена, кодирующего транспортер натрий/йода мыши (mNIS) и ген онкотоксического белка апоптина вируса анемии цыплят (Apo) (см. рисунок). Трансгены, кодирующие белки апоптин и mNIS, встроены в районы делетированных вирусных генов VGF и tk соответственно.

Для осповакцины различают ранние, поздние и ранне-поздние промоторы, регулирующие экспрессию генов на разных этапах репликации вируса. В варианте VV-mNIS-Apo трансген mNIS контролируется ранне-поздним промотором (P7,5), а в VV-P11mNIS-Apo — поздним промотором P11. Использование разных промоторов для экспрессии mNIS связано с особенностями белка, который олигомеризуется в зависимости от концентрации.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение от 30.05.2025 № 075-15-2025-452).

© Д. В. Дроков, К. А. Лапшин, А. В. Семенова, А. А. Гражданцева, А. А. Легкодымов, Г. В. Кочнева, 2025



Схематичное изображение структуры генома рекомбинантных вариантов VACV

Исследования показали, что гиперэкспрессия человеческого ортолога NIS (hNIS) под контролем ранне-позднего промотора приводит к агрегации и снижению активности белка. При использовании позднего промотора hNIS представлен в димерной форме и эффективно аккумулирует ^{131}I в раковых клетках HeLa [2].

Таким образом, целью работы является сравнение йод-аккумулирующей и онкотоксической активностей двух рекомбинантных вариантов VACV с трансгенами Apo и mNIS под контролем различных промоторов: P7,5 и P11.

Для оценки чувствительности опухолевых клеток человека к тестируемым рекомбинантным штаммам VACV проведена сравнительная оценка их онколитической активности в отношении ряда опухолевых клеток различного органного и тканевого генеза, а именно: карциномы кожи A431, меланомы Mel8, карциномы молочной железы MDA-MB-231 и двух культур клеток глиобластомы U343 и U87 MG. Оценка проводилась с помощью колориметрического метода с использованием реагента XTT. Выяснилось, что наиболее чувствительной к действию обоих штаммов является культура A431. Наиболее устойчивыми оказались культуры клеток: U343, MDA-MB-293, Mel8.

При помощи метода рентгенофлуоресцентного элементного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ) была осуществлена сравнительная оценка накопления нерадиоактивного йода *in vitro* в опухолевых клетках, инфицированных VV-mNIS-Apo и VV-P11mNIS-Apo. Анализ показал, что концентрация нерадиоактивного йода значительно выше в опухолевых клетках культуры A431, инфицированных штаммом VV-P11mNIS-Apo, чем в клетках, инфицированных штаммом VV-mNIS-Apo и клетках контрольной группы.

Исследование накопления нерадиоактивного йода *ex vivo* в ксенографтах опухоли A431, подкожно трансплантированной иммунодефицитным мышам линии nude при виротерапии рекомбинантным штаммом VV-P11mNIS-Apo, показало, что у мышей, подвергавшихся виротерапии, концентрация йода в опухолях достоверно выше (p-value = 0,0043 < 0,05), чем в контрольной группе, не получавшей лечение рекомбинантным штаммом.

На основании полученных данных штамм VV-P11mNIS-Apo можно рассматривать как перспективный препарат для виротерапии и диагностики (тераностики) злокачественных опухолей.

Литература

1. Moss B. Poxvirus DNA replication // Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 2013. Vol. 5, No. 9. P. a010199.

2. Wang J. et al. Enhancing expression of functional human sodium iodide symporter and somatostatin receptor in recombinant oncolytic vaccinia virus for in vivo imaging of tumors // J. Nucl. Med. 2017. Vol. 58, No. 2. P. 221–227.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-198

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА A/H5NX

AN INTEGRATED APPROACH TO OBTAINING AND CHARACTERIZING GLYCOPROTEINS OF CIRCULATING A/H5NX INFLUENZA VIRUS VARIANTS

Э. В. Дубровская[1,2], Г. С. Онхонова[2], И. Р. Иматдинов[2]

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

E. V. Dubrovskaya[1,2], G. S. Onkhonova[2], I. R. Imatdinov[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ dubrovskaya_jev@vector.nsc.ru

Аннотация

За последние годы вирус высокопатогенного гриппа птиц был обнаружен на территориях всех континентов. По состоянию на июль 2025 г. зафиксировано более 100 случаев заражения людей [1, 2], тысячи инфицированных животных, гибель скота и птицы [3]. Ввиду возрастающих эпидемиологических рисков в рамках данного исследования разработан подход, позволяющий быстро получить и изучить функциональные гликопротеины циркулирующих вариантов вируса гриппа птиц.

Abstract

In recent years, the highly pathogenic avian influenza virus has been detected across all continents. As of July 2025, over 100 human cases [1, 2], thousands of infected animals, and deaths of livestock and poultry have been recorded [3]. Due to increasing epidemiological risks, this study presents an approach for rapid isolation and analysis of functional glycoproteins from circulating avian influenza virus variants.

Вирус высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП), ранее циркулирующий преимущественно в популяциях птиц, все чаще выявляется у диких и домашних животных [3] и становится причиной спорадических случаев инфицирования людей, зачастую характеризующихся тяжелыми клиническими проявлениями. На июль 2025 г. особенно напряженная эпизоотическая обстановка наблюдается на территориях Северной Америки и Юго-Восточной Азии. Ввиду того, что вирус гриппа A/H5Nx переносится в основном водоплавающими перелетными птицами, миграционные пути которых пролегают через весь евразийский материк, не исключена вероятность заноса и распространения вируса ВПГП среди птиц и млекопитающих в Российской Федерации. В связи с этим существует необходимость изучения антигенных и молекулярно-биологических свойств циркулирующих и вновь возникающих вариантов вируса гриппа A/H5Nx. Проведению исследований препятствуют значительные различия нуклеотидных последовательностей 4-го и 6-го сегментов генома актуальных вариантов вируса гриппа A/H5Nx, изолированных с территорий Российской Федерации, Северной Америки и Юго-Восточной Азии. Для преодоления этого ограничения разработан комплексный подход, направленный на получение генов HA и NA циркулирующих вариантов вируса гриппа A/H5Nx методами генной инженерии, с последующим изучением их свойств посредством экспонирования функциональных гликопротеинов на поверхности ВПЧ.

Разработанный подход включает в себя четыре этапа: 1) биоинформатический анализ и дизайн генетических конструкций; 2) мутагенез и клонирование синтетических генов, кодирующих гликопротеины циркулирующих вариантов вируса гриппа A/H5Nx; 3) псевдотипирование репликационно-дефектных вирусов функциональными гликопротеинами — гемагглютинином (HA) и нейраминидазой (NA); 4) изучение антигенных и молекулярно-биологических свойств экспонированных вирусных гликопротеинов с использованием серологических, вирусологических и биофизических методов.

Задачей первого этапа являлся анализ последовательностей HA и NA разных вариантов вируса гриппа A/H5Nx с использованием комплекса биоинформатических методов, позволяющих выявить замены, отсутствующие в прототипных экспрессирующих конструкциях. После дизайна генетических конструкций и подбора олигонуклеотидных праймеров проводили сайт-направленный мутагенез с целью получения модифицированных фрагментов генов 4-го и 6-го сегментов циркулирующих вариантов вируса ВПГП. Бесшовная сборка фрагментов генов после мутагенеза осуществляли методом ПЦР с перекрывающимися концами. Полученные синтетические

© Э. В. Дубровская, Г. С. Онхонова, И. Р. Иматдинов, 2025

гены клонированы с использованием классических генно-инженерных методов в акцепторном экспрессирующем плазмидном векторе. Корректность нуклеотидных последовательностей подтверждали методами рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру. Наработанные плазмидные конструкции использовали для псевдотипирования лентивирусных ВПЧ и рекомбинантного вируса везикулярного стоматита rVSV_dG_mNeonGreen. Функциональную активность экспонированных гликопротеинов подтверждали с использованием пермиссивной культуры клеток (MDCK и HEK293T) — инфекционные титры псевдотипированных ВПЧ составили от 4,16(±0,21) × 10^6 ФОЕ/мл до 9,23 (±0,36) × 10^6 ФОЕ/мл. Псевдотипированные вирусные частицы использовали для постановки РГА, РТГА и реакции вируснейтрализации с сыворотками крови животных, в том числе полученными на антигены вируса гриппа штамм A/chicken/Astrakhan/2171-1/2020 (H5N8). Гемагглютинирующие титры псевдотипированных ВПЧ варьировались от 640 до 2560 ГАЕ/мл. Охарактеризованные псевдотипированные ВПЧ использованы для изучения рецепторной специфичности (α2,6 и/или α2,3) полученных гемагглютининов вариантов вируса гриппа A/H5Nx методом бислойной интерферометрии.

Таким образом, предложенный комплексный подход нацелен на безопасное и ускоренное исследование молекулярно-биологических и антигенных свойств воспроизведенных гликопротеинов вирусов гриппа А и В. Результаты исследований вирусных гликопротеинов (или отдельных мутаций в них) позволяют прогнозировать потенциальные риски для обеспечения биологической безопасности населения при (1) заносе и распространении новых вариантов вируса ВПГП, (2) возникновении ключевых мутаций в циркулирующих субтипах, (3) преодолении межвидовых барьеров, а также (4) исследовать вируснейтрализующие свойства сывороток, полученных в ходе исследования кандидатных вакцинных препаратов против гриппа A/H5Nx.

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Обновленная совместная оценка общественного здравоохранения ФАО/ВОЗ/WOAH недавних случаев заражения вирусом гриппа A(H5) у животных и людей // Всемирная организация здравоохранения. URL: https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/avian-influenza/avian-a-h5n1-virus (дата обращения: 21.07.2025).

2. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Сообщения о вспышках заболеваний // Всемирная организация здравоохранения. URL: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news (дата обращения: 21.07.2025).

3. Capelastegui F., Goldhill D. H. H5N1 2.3.4.4b: a Review of Mammalian Adaptations and Risk of Pandemic Emergence // J. General Virol. 2025. Vol. 106, No. 6.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-199

ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ОБНАРУЖЕНИЯ *ORTHOHANTAVIRUS DOBRAVAENSE* В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ *

THE FIRST FINDING OF *ORTHOHANTAVIRUS DOBRAVAENSE* IN VOLGA FEDERAL DISTRICT

П. И. Елбоева, Т. Р. Насыров, Ю. Н. Давидюк, Э. Кабве

Казанский (Приволжский) федеральный университет

P. I. Elboeva, T. R. Nasyrov, Y. N. Davidyuk, E. Kabwe

Kazan Federal University

✉ polinaelboeva@mail.ru

Аннотация

Orthohantavirus dobravaense (DOBV) является одним из возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом в европейской части России. Нами впервые на территории Приволжского федерального округа (в Ульяновской области) был выявлен штамм DOBV. По результатам проведенной молекулярно-генетической идентификации секвенированных участков S- и M-сегментов генома и филогенетического анализа выявленный штамм относится к сублинии *Kurkino*.

Abstract

Orthohantavirus dobravaense (DOBV) is one of the causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome in the European part of Russia. For the first time in the Volga Federal District (Ulyanovsk Region), we identified a DOBV strain. Based on molecular genetic identification of the sequenced fragments of the S and M genome segments and subsequent phylogenetic analysis, the detected strain was assigned to the *Kurkino* sublineage.

Введение

Ряд вирусов рода *Orthohantavirus* является зоонозными патогенами — возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Геном ортохантавирусов представлен трехсегментной одноцепочечной РНК негативной полярности. S-сегмент кодирует нуклеокапсидный белок (N-белок), M-сегмент — предшественника гликопротеинов (GPC), а L-сегмент — РНК-зависимую РНК-полимеразу [1].

Orthohantavirus dobravaense (DOBV) — высокопатогенный представитель рода, вызывающий форму ГЛПС, характеризующуюся более тяжелым течением и высокой летальностью до 12 % по сравнению с ГЛПС, вызванной *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV). У DOBV различают три генетические линии: *Belgrade*, *Sochi* и *Kurkino*. Для каждой линии существует специфичный резервуарный хозяин: *Apodemus flavicollis* для линии *Belgrade*, *A. ponticus* — для *Sochi* и *A. agrarius* — для *Kurkino* [2]. В настоящее время информация о распределении генетических вариантов DOBV на территории Приволжского федерального округа (ПФО) отсутствует. Поэтому целью исследования было выявление штаммов DOBV, циркулирующих на территории ПФО.

Материалы и методы

Общую РНК выделяли из образцов легочной ткани грызунов из популяций 12 субъектов РФ и проводили скрининг на наличие DOBV методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Для ПЦР-положительных образцов синтезировали кДНК, амплифицировали участки S- и M-сегментов генома методом ПЦР и продукты амплификации секвенировали по Сэнгеру. Выравнивание нуклеотидных последовательностей (НП) и филогенетический анализ выполняли в программе MEGA6 [3]. В качестве референсных использовали штаммы DOBV из ряда европейских стран, НП геномов которых размещены в базе данных GenBank. В качестве внешней группы использовался *Orthohantavirus hantanense* (HNTV).

По результатам скрининга исследованных образцов ортохантавирусная РНК была обнаружена в 3 из 564 образцов. Для одного образца из Чердаклинского района Ульяновской области (УО) были получены последовательности S-сегмента длиной 629 нуклеотидов и M-сегмента длиной 441 нуклеотид. Сравнительный анализ выявил наибольшую гомологию с референсными штаммами линии *Kurkino* из Липецкой области (ЛО), разница в НП составила 6,7 % для S-сегмента и 8,5 % для M-сегмента. Разница в аминокислотных последовательностях (АП) N-белка и GPC находились в диапазоне 0–0,5 и 1,4–2,1 % соответственно. При сравнении с референсными штам-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-24-00186).

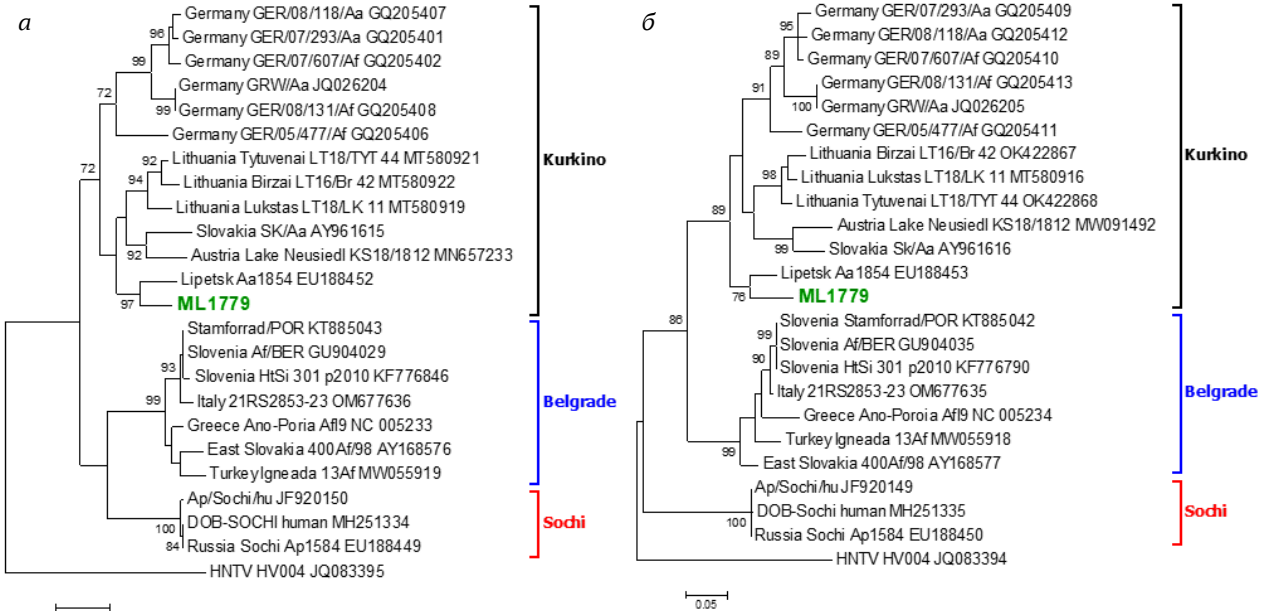
© П. И. Елбоева, Т. Р. Насыров, Ю. Н. Давидюк, Э. Кабве, 2025

мами линий *Sochi* и *Belgrade* значения различий для S-сегмента находились в интервале 15,2–17,3 и 14,2–17,3 %, для M-сегмента — 24,0–24,4 и 12,5–19,6 % соответственно (см. таблицу).

Разница в НП и АП между выявленным и референсными штаммами DOBV, %

Область генома / белок	*Sochi*	*Belgrade*	*Kurkino*
S-сегмент	15,2–17,3	14,2–17,3	**6,7–13,2**
N-белок	1,5	1,5–2,1	**0,0–1,0**
M-сегмент	24,0–24,4	12,5–19,6	**8,5–17,2**
GPC-полипротеин	6,3–7,0	1,4–7,0	**0,07–2,8**

Филогенетические деревья, построенные для участков S- и M-сегментов, характеризуются схожей топологией (см. рисунок). Штамм ML1779 образует единую субкладу со штаммом из ЛО, относящимся к линии *Kurkino*. Поэтому выявленный штамм можно идентифицировать как DOBV линии *Kurkino*.



Филогенетические деревья, построенные методом Maximum Likelyhood для участков генома DOBV: *а* — S-сегмента; *б* — M-сегмента. Значения бутстрепов ниже 70 не показаны

Ранее в соседнем Мелекесском районе УО были выявлены штаммы PUUV [1]. Таким образом, на территории области коциркулируют два вида ортохантавирусов. Ранее был описан подобный случай коциркуляции ортохантавирусов в Башкирии [4].

Нужно отметить, что выявленный нами штамм сублинии *Kurkino* впервые в РФ был выделен из *A. flavicollis*, тогда как обнаруженные ранее штаммы *Kurkino* ассоциированы с *A. agrarius*. В то же время *A. flavicollis* является природным резервуаром для DOBV линии *Belgrade*. Таким образом, можно сделать вывод, что *A. flavicollis* способен быть носителем двух генетических линий вируса.

Литература

1. Kabwe E., Al Sheikh W. et al. Analysis of Puumala orthohantavirus Genome Variants Identified in the Territories of Volga Federal District // Tropical Med. Infectious Disease. 2022. Vol. 7. P. 46.

2. Papa A. Dobrava-Belgrade virus: phylogeny, epidemiology, disease // Antiviral Res. 2012. Vol. 95, No. 2. P. 104–117.

3. Tamura K., Stecher G. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30, No. 12. P. 2725–2729.

4. Мочалкин П. А., Акимкин В. Г. и др. Сочетанная циркуляция хантавирусов Пуумала, Тула, Сивис на территории Республики Башкортостан // Проблемы особо опасных инфекций. 2024. № 2. С. 140–147.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-200

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ *

METHOD FOR STUDYING DRUG BIOAVAILABILITY USING IMAGING FLOW CYTOMETRY

К. А. Елфимов, Л. Г. Готфрид, М. П. Гашникова, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова

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

K. A. Elfimov, L. G. Gotfrid, M. P. Gashnikova, A. V. Totmenin, N. M. Gashnikova

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ elfimovkiril@yandex.ru

Аннотация

Разработан подход для оценки биодоступности химических соединений с помощью проточной цитометрии с визуализацией. Протокол включает анализ проникновения, локализации и распределения соединений в клетках с расчетом биологически значимых параметров и статистической обработкой результатов. Предлагаемый подход заполняет существующие ограничения микроскопии и проточной цитометрии.

Abstract

An approach to assess the bioavailability of chemical compounds using imaging flow cytometry has been developed. The protocol includes analysis of internalization, localization and distribution of compounds in cells with calculation of biologically relevant parameters and statistical processing of results. The proposed approach fills the existing limitations of microscopy and flow cytometry.

Введение

Современные методы машинного обучения помогают достаточно точно предсказать эффективные соединения во время разработки лекарств [1], однако не меньшее внимание уделяется способам доставки препаратов [2]. Как правило, способность к проникновению оценивается качественным или полуколичественным образом с помощью методов микроскопии и проточной цитометрии. Однако проточная цитометрия не предоставляет информации о локализации меченного соединения, в то время как данные микроскопии обладают низкой статистической мощностью из-за малого количества рассматриваемых объектов.

В этой работе мы представляем подход исследования клеточной биодоступности лекарственных соединений с помощью проточной цитометрии с визуализацией, которая способна заполнить эти пробелы.

Материалы и методы

Для демонстрации использовался набор экспериментальных антисмысловых олигонуклеотидов (AOS) с антиретровирусной активностью [3], которые инкубировались с клетками иммортализованной культуры MT-4 в питательной среде RPMI-1640 с 10 % FBS.

Проточная цитометрия с визуализацией проводилась на платформе Amnis FlowSight. Клетки окрашивали AOS-FAM, PI и антителами к CD4, конъюгированными с AF700. Для экстинкции использовался лазер с длиной волны 488 нм и мощностью 60 МВт. Детекция эмиссия проводилась в канале FAM (фильтр 532/55 нм) и PI (фильтр 577/35 нм). Изображения были получены при общем увеличении в 20 раз (NA = 0,6) и размере пикселя 1 × 1 мкм.

Анализ результатов проточной цитометрии проводился в ПО IDEAS 6.2. Статистический анализ проводился с помощью языка программирования R (v. 4.3.0). Для визуализации результатов использовалось ПО GraphPad Prism (v. 10.0.0).

Результаты

Созданный пайплайн включает в себя запись клеток, анализ токсичности, абсорбции и проникновения и внутриклеточного распределения соединения.

Первый этап содержит окрашивание клеток витальным красителем (PI, 2 мкг/мл, 2 мкл/образец) и запись событий (клеток) на проточном цитометре. Для анализа использовались только живые единичные клетки (рис. 1).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 1/23).

© К. А. Елфимов, Л. Г. Готфрид, М. П. Гашникова, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова, 2025

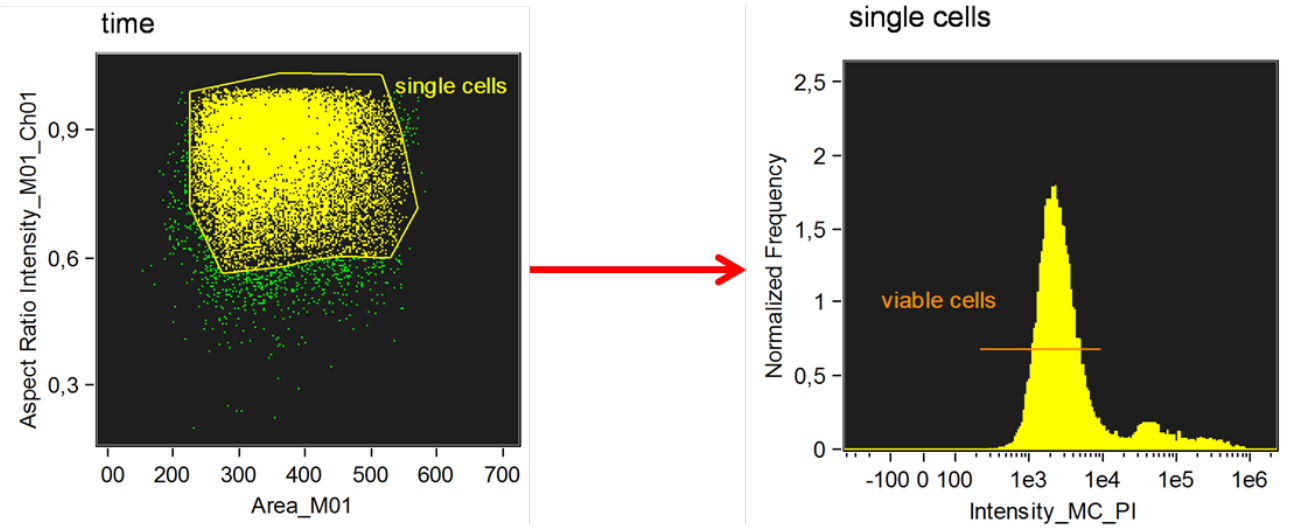


Рис. 1. Гейтирование единичных живых клеток на первом этапе анализа результатов

Второй этап состоит из дополнительного гейтирования клеток, попавших в фокус камеры цитометра. Дополнительно рекомендуется выделить популяцию *time*, которая состоит из событий, прошедших через точку интеррогации через 10–15 с после стабилизации ламинарного потока, поскольку на старте записи возможен заброс клеток из предыдущего образца (рис. 2).

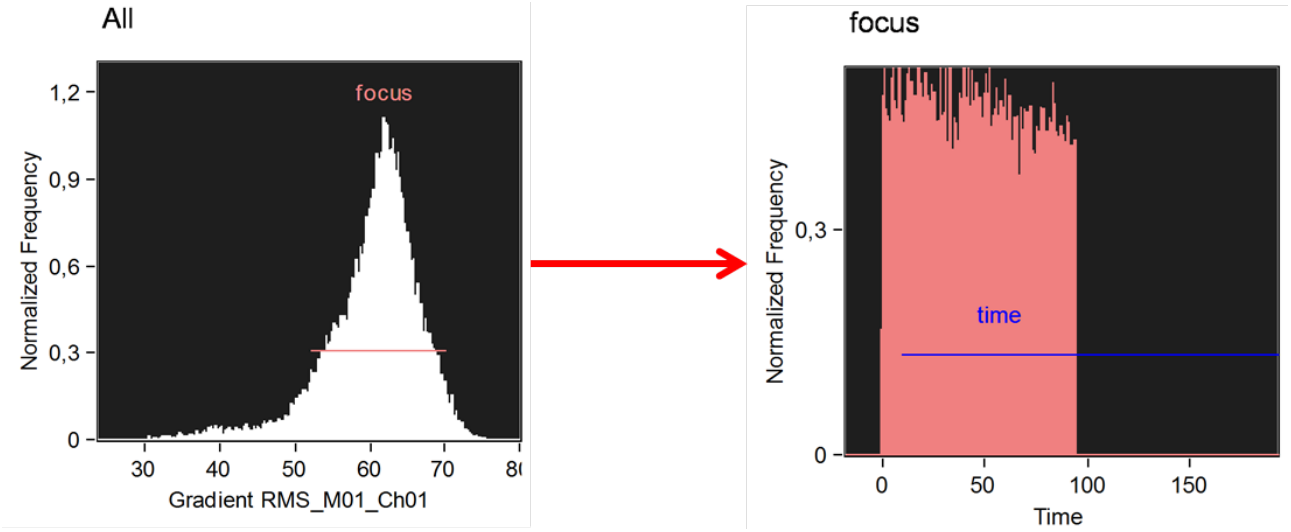


Рис. 2. Гейтирование клеток в фокусе камеры и клеток, прошедших через камеру проточного цитометра после 10–15 с от начала записи событий

Третий этап включает в себя создание масок, которые бы выделяли нужную нам область клетки из общей маски изображения. В этой работе используется маски, выделяющие область цитоплазмы (Cytoplasm) и цитоплазматической мембраны (Membrane), но если целевой компартмент соединения — ядро, то возможно создание маски и этой области (Nucleus). Если исследуемое соединение должно связываться с определенным ферментом или органоидом, то IDEAS 6.2 содержит помощник Colocalization, который поможет отобразить долю флуоресценции метки, которая находится в одном компартменте с мишенью.

Четвертый этап содержит анализ результатов, включающих долю жизнеспособных клеток, долю клеток с меткой, долю клеток с меткой внутри цитоплазмы или какого-либо компартмента, индекс интернализации (отношение сигнала внутри клетки к сигналу снаружи) и энтропию Шеннона (демонстрирует равномерность распределения метки внутри маски) (рис. 3).

Последний этап содержит статистический анализ результатов. Значимость различий между группами определяется с помощью дисперсионного анализа (F-критерий) с последующими попарными сравнениями критерия Тьюки. Для оценки вклада биодоступности в исследуемую активность препарата рассчитывается величина эффекта с использованием омега-квадрата (ω^2). Открытый код статистической обработки в R, демонстрационные файлы (rif) и примеры обработки результатов в IDEAS 6.2 (daf, cif) находятся в облачном хранилище (https://disk.yandex.ru/d/KrjTge7ouTSobg).

Заключение

Разработанный пайплайн позволяет исследовать токсичность, проникновение, стабильность и транспорт исследуемых молекул внутри клеток при условии наличия у последних флуоресцентной метки. В рамках работы был создан полный цикл манипуляций: от проведения цитометрического исследования до статистической обработки ее результатов. Предлагаемый подход имеет высокую статистическую мощность и скорость исследования, является воспроизводимым и не требует глубокого обучения сотрудников для начала работы.

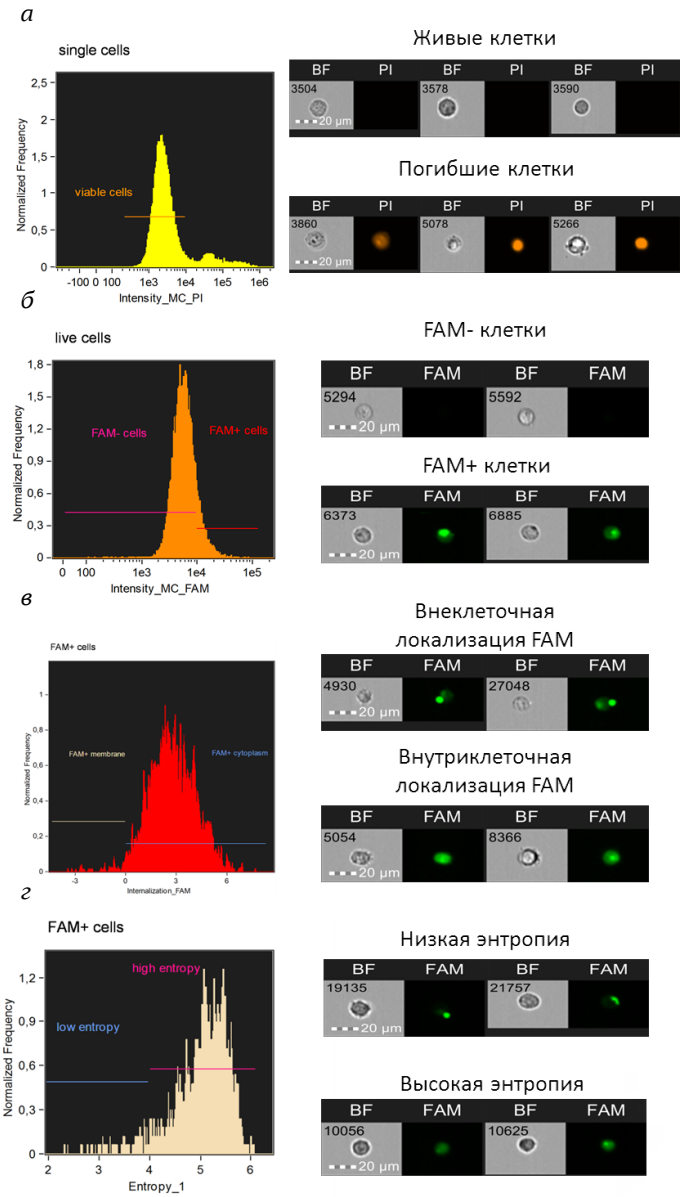


Рис. 3. Демонстрация биологически значимых параметров биодоступности соединений: *а* — токсичность; *б* — абсорбция; *в* — проникновение (интернализация); *г* — энтропия

Литература

1. Dara S., Dhamercherla S., Jadav S. S. et al. Machine learning in drug discovery: a review // Artif. Intelligence Rev. 2022. Vol. 55 (3). P. 1947–1999.

2. Ramadon D., McCrudden M. T. C., Courtenay A. J. et al. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications // Drug Delivery Translational Res. 2022. Vol. 12 (4). P. 758–791.

3. Gotfrid L. G., Elfimov K. A., Gashnikova M. P. et al. Investigation of the Activity of LNA-Modified Phosphorothioate Oligonucleotides Against HIV-1 // Preprints.org. 2025. P. 18. (Препринт).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-201

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ СРЕДИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ*

ANALYSIS OF CLINICAL SIGNIFICANT MUTATIONS AMONG ISOLATES OF HEPATITIS B VIRUS CIRCULATING IN THE REPUBLIC OF GUINEA

А. С. Железнова, К. А. Свирин, М. Ю. Карташов

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

A. S. Zheleznova, K. A. Svirin, M. Yu. Kartashov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ zheleznova_as@vector.nsc.ru

Аннотация

Было получено 75 полногеномных последовательностей ВГВ, которые были генотипированы и проанализированы на предмет наличия клинически значимых мутаций. Все выявленные изоляты ВГВ относятся к генотипу E. В 16 % выявленных изолятов ВГВ обнаружены escape-мутации, в 100 % — мутации, связанные с прогрессированием заболевания. Мутации лекарственной устойчивости и мутации областей PreS1/PreS2 не обнаружены среди выявленных изолятов ВГВ.

Abstract

75 full-genome HBV sequences were obtained, which were genotyped and analyzed for the presence of clinically significant mutations. All identified HBV isolates belong to genotype E. Escape mutations were found in 16 % of the identified HBV isolates, and mutations associated with disease progression were found in 100 % of the identified HBV isolates. Mutations of drug resistance and mutations of preS1/preS2 regions were not found among the identified HBV isolates.

Введение

За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в изучении вируса гепатита В (ВГВ) и разработке мер по контролю ВГВ-инфекции (разработка рекомбинантной вакцины против ВГВ и ее применение в массовой вакцинации, производство противовирусных препаратов, усовершенствование лабораторной диагностики ВГВ). Однако проблема ВГВ-инфекции все еще остается одной из самых важных проблем здравоохранения как в мире, так отдельно для региона Западной Африки, являющегося высокоэндемичным для этой инфекции.

Геном ВГВ состоит из частично двухцепочечной кольцевой ДНК протяженностью приблизительно 3200 нуклеотидов и представлен генами S, P, C (Core) и X, кодирующими за счет перекрывающихся открытых рамок считывания 7 белков. В последнее время уделяется много внимания генетической вариабельности ВГВ: различные генотипы ВГВ влияют на течение и исход заболевания, а также проблему усугубляет высокая мутационная изменчивость ВГВ. Известные клинически значимые мутации ВГВ можно разделить на следующие группы: мутации вакцинного ускользания (ген S); мутации лекарственной устойчивости (ген P); мутации, связанные с прогрессированием заболевания (гены X и Core, а также области PreCore, PreS1 и PreS2).

Цель работы — получение полноразмерных последовательностей генома и молекулярно-генетическая характеризация генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Западной Африки (Гвинейская Республика).

Материалы и методы

В ходе исследования было получено и проанализировано 75 полногеномных последовательностей изолятов ВГВ. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq путем таргетного обогащения с использованием разработанной нами панели олигонуклеотидных праймеров, покрывающих полный геном ВГВ. Полученные последовательности ВГВ были проанализированы для определения их генотипов и субгенотипов с помощью методов филогенетического анализа, наличие клинически значимых мутаций определяли в соответствии с существующей научной литературой.

* Исследование выполнено в рамках реализации Федерального проекта «Санитарный щит — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)»: «Экстерриториальный мониторинг инфекционных угроз на базе Центра ВОЗ по реагированию на эпидемии и сети центров за рубежом — Научно-методическое и практическое взаимодействие на базе Российско-Гвинейского Центра».

© А. С. Железнова, К. А. Свирин, М. Ю. Карташов, 2025

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. Проведение описываемой научной работы одобрено решением Этического комитета Гвинеи (протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015).

Результаты и обсуждение

Все выявленные изолятов ВГВ относятся к генотипу E и хорошо кластеризуются с прототипными вариантами, циркулирующими в Западной Африке. Мутации лекарственной устойчивости и мутации областей PreS1/PreS2 среди выявленных изолятов не обнаружены. Выявлены следующие вакцинно-ускользающие мутации: Q101H (2/75, 2,7 %, 95 % ДИ = 0,7–9,2 %), T115N (1/75, 1,3 %, 95 % ДИ = 0,2–7,2 %), I/T126N (1/75, 1,3 %, 95 % ДИ = 0,2–7,2 %), A128V (3/75, 4,0 %, 95 % ДИ = 1,4–11,1), Q129R/H (3/75, 4,0 %, 95 % ДИ = 1,4–11,1), F/Y134I/V (3/75, 4,0 %, 95 % ДИ = 1,4–11,1) и S143L (1/75, 1,3 %, 95 % ДИ = 0,2–7,2 %). Также выявлены мутации, связанные с ускоренным прогрессированием заболевания: A1762T+G1764A(BCP), W28* и G29D (PreCore), F24Y, E64D, E77Q и A80T/V (Core), а также мутации гена Core, связанные с ускоренным прогрессированием заболевания и ускользанием от иммунитета: E113Q, L116I/V, T114V, A131P и T146N. Во всех исследуемых полногеномных последовательностях была выявлена хотя бы одна мутация гена X, связанная с прогрессированием заболевания, при этом тройная мутация V5M/L + K130M + V131I выявлена в 29 последовательностях (38, 7 %, 95 % ДИ = = 28,5–50,0 %), двойная мутация V5M/L + V131I — в 4 (5,3 %, 95 % ДИ = 2,1–12,9 %), мутация V5M/L — в 41 (54,7 %, 95 % ДИ = 43,4–65,4 %). Среди других обнаруженных мутаций гена X следует отметить H94Y, обнаруженную в 14,7 % (11/75, 95 % ДИ = 8,4–24,4 %).

Заключение

Филогенетический анализ показал циркуляцию единственного генотипа ВГВ (генотип E) в изучаемой выборке. Широкая распространенность мутаций иммунного ускользания и мутаций, связанных с ускоренным прогрессированием заболевания, представляет собой серьезную проблему и может косвенно объяснить причину эндемичности ВГВ и высокой частоты ГЦК в регионе Западной Африки. Актуализация данных по генотипическому разнообразию ВГВ позволяет отслеживать пути передачи, появление и распространение новых вариантов вирусов, в том числе с клинически значимыми мутациями.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-202

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ГРИППА В ВИКТОРИАНСКОЙ ЛИНИИ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2024–2025 ГОДОВ

GENETIC ANALYSIS OF INFLUENZA B VIRUSES VICTORIA LINEAGE CIRCULATED IN RUSSIA IN 2024–2025 EPIDEMIC SEASON

А. И. Желтухина, А. В. Фадеев, М. М. Писарева, В. А. Едер,
М. Коржанова, А. Б. Комиссаров, Д. М. Даниленко

НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

A. I. Zheltukhina, A. V. Fadeev, M. M. Pisareva, V. A. Eder,
M. Korzhanova, A. B. Komissarov, D. M. Danilenko

Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

✉ alena.zheltuhina@influenza.spb.ru

Аннотация

Все вирусы гриппа В, циркулировавшие в России в эпидемический сезон 2024–2025 гг., относились к Викторианской линии и принадлежали к генетическому клайду V1A.3a.2, к которой относится и вирус В/Австрия/1359417/2021, рекомендованный ВОЗ для включения в состав трехвалентных и четырехвалентных гриппозных вакцин на сезоны 2024–2025 и 2025–2026 гг. для Северного полушария. В России наблюдалась коциркуляция вирусов гриппа В подклайдов С.5.1, С.5.6, С.5.7, входящих в состав клайда V1A.3a.2 (С.5) и несущих характерную для этой группы замену в молекуле гемагглютинина D197E.

Abstract

All influenza B viruses from Russia circulated during the 2024-2025 epidemic season belonged to the V1A.3a.2 genetic clade (Victoria lineage), which includes the B/Austria/1359417/2021 virus recommended by WHO for trivalent and quadrivalent influenza vaccines for the 2024-2025 and 2025-2026 seasons in Northern Hemisphere. In Russia, co-circulation of influenza viruses of subclades C.5.1, C.5.6, C.5.7 was observed as part of clade V1A.3a.2 (C.5) and carrying D197E substitution in the hemagglutinin molecule characteristic of this group.

Последние 5 лет для всех циркулирующих вирусов гриппа В Викторианской линии наблюдается высокое генетическое разнообразие внутри клайда V1A.3a.2 — ежегодно выявляются новые генетические группы с разными наборами аминокислотных замен, часть из которых располагается в антигенных сайтах и приводит к утрате или возникновению потенциальных сайтов гликозилирования. Своевременное выявление новых аминокислотных замен необходимо для понимания эволюции вирусов гриппа В, что, свою очередь играет ключевую роль в выборе штаммов-кандидатов в состав противогриппозных вакцин [1].

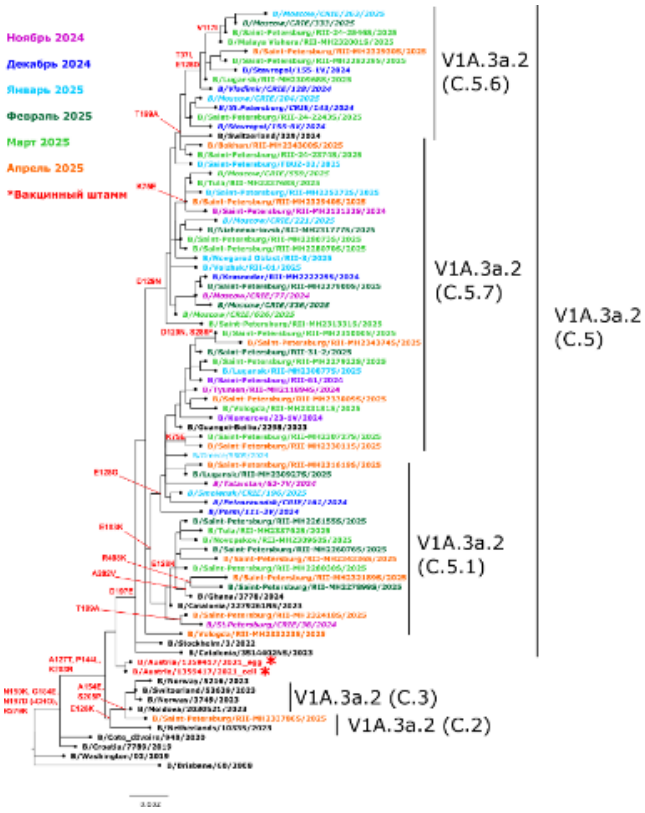
Для исследования всего было генетически охарактеризовано 578 вирусов гриппа В, включая как изоляты, так и ПЦР-положительные на грипп В назофарингеальные мазки. NGS-секвенирование исследованных вирусов проводилось с использованием платформ MGI и Illumina.

Все вирусы гриппа В, циркулировавшие в России в эпидемический сезон 2024–2025 гг., относились к Викторианской линии и принадлежали к генетическому клайду V1A.3a.2, к которой относится и вирус В/Австрия/1359417/2021, рекомендованный ВОЗ для включения в состав трехвалентных и четырехвалентных гриппозных вакцин на сезоны 2024–2025 и 2025–2026 гг. для Северного полушария, и несли характерные для этой группы замены в молекуле гемагглютинина — A127T, P144L и K203R (см. рисунок).

Большинство исследованных вирусов гриппа В принадлежали к генетической группе С.5 с характерной заменой D197E (антигенный сайт спираль-190) — в настоящее время представители этой группы доминируют в популяции вирусов гриппа В Викторианской линии. Исключение составил вирус В/Санкт-Петербург/MH233786S/2025, который принадлежал к генетической группе С.3 (референс-вирус В/Молдова/2030521/2023), с заменами E128K, A154E, S208P. Стоит отметить, что две замены этой группы относятся к антигенным сайтам — петля-120 (E128K) и петля-150 (A154E), однако при этом данная группа оказалась минорной в вирусной популяции, в отличие от группы С.5, несущей одну замену в антигенном сайте спираль-190. Преобладание вирусов, относящихся к группе С.5, может свидетельствовать о том, что замены в данном эпитопе являются более значимыми для успешного уклонения вируса от иммунитета хозяина (даже если замены не приводят к потере потенциального сайта гликозилирования, располагающегося в данном антигенном сайте). Внутри группы С.5

© А. И. Желтухина, А. В. Фадеев, М. М. Писарева, В. А. Едер, М. Коржанова, А. Б. Комиссаров, Д. М. Даниленко, 2025

вирусы, циркулировавшие в указанный период, формировали несколько подгрупп: подгруппа с заменой E180K; подгруппа с заменой E128G; подгруппа с заменой D129N (субклайд C.5.6). Для подгруппы C.5.1, B/Каталония/2279261NS/2023-подобной, были характерны аминокислотные замены в молекуле гемагглютинина E183K, E128K, A202V, R498K и E128G; для подгруппы C.5.7, B/Гуанси-Бэйлю/2298/2023-подобной, — замены D129N, K75E, S286F и для подгруппы C.5.6, подобной референс-штамму B/Швейцария/329/2024, — замены T199A, T37I, E128D, V117I. На рисунке представлено филогенетическое дерево, где отмечены вышеперечисленные замены в молекуле гемагглютинина.



Филогенетическое сравнение генов HA гриппа B Викторианской линии (метод ML, GTR + GAMMA, создано с помощью RaxML)

Большинство выявленных замен располагалось в антигенном сайте петли-120 — это замены K75E, V117I, A127T, E128D, E128G, E128K и D129N. Часть замен была выявлена в антигенном сайте спираль-190 — к ним относились замены D197E, T199A, A202V и K203R. Также выявлены замены в антигенном сайте петля-150 — P144L, A154E и A154T. Хотя петля-120 подвержена сильной позитивной селекции и несинонимичные замены происходят в ней чаще, чем в остальных антигенных сайтах [2], тот факт, что наибольшее распространение получила группа C.5, отличающаяся наличием замены в спирали-190, которая тоже подвержена позитивной селекции [3], может свидетельствовать о том, что замены в данном эпитопе являются более значимыми для успешного уклонения от иммунного ответа. Также внутри группы C.5 сформировалось несколько подгрупп, несущих новые замены в спирали-190, в связи с чем можно предположить, что данные группы могут получить более широкое распространение в следующих эпидемических сезонах.

Литература

1. Influenza Virus Genome Sequencing and Genetic Characterization. URL: https://www.cdc.gov/flu/php/viruses/genetic-characterization.html (accessed: 04.08.2025).

2. Suptawiwat O., Ninpan K., Boonarkart C. et al. Evolutionary dynamic of antigenic residues on influenza B hemagglutinin // Virology. 2017. Vol. 502. P. 84–96.

3. Shen J., Kirk B. D., Ma J., Wang Q. Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin // J. Med. Virol. 2009. Vol. 81 (1). P. 114–124.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-203

РАЗРАБОТКА ЛЕТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕКТИВНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕПАРАТОВ

DEVELOPMENT OF A LETHAL MODEL OF WEST NILE FEVER TO STUDY THE PROTECTIVE EFFECTIVENESS OF VARIOUS DRUGS

А. А. Илюхина, И. Д. Зорков, Д. М. Гроусова, Е. В. Коробова, О. В. Зубкова, И. В. Должикова

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

A. I. Ilyukhina, I. D. Zorkov, D. M. Grousova, E. V. Korobova, O. V. Zubkova, I. V. Dolzhikova

D. I. Ivanovskiy Institute of Virology, N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ grousova@gamaleya.org

Аннотация

Существующие модели лихорадки Западного Нила (ЛЗН) у животных, применяемые для исследования защитных свойств различных препаратов, являются труднодоступными или нелетальными. Нами была разработана летальная модель ЛЗН у мышей линии C57BL/6 с комбинированной индуцированной иммуносупрессией, демонстрирующая 100%-ю гибель животных, зараженных различными генотипами вируса Западного Нила.

Abstract

Existing West Nile Fever (WNF) animal models used to study the protective properties of various drugs are difficult to access or non-lethal. We have developed a lethal model of WNF in C57BL/6 mice with combined induced immunosuppression, demonstrating 100 % mortality of animals infected with various genotypes of West Nile virus.

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) — вирусное заболевание, передающееся человеку через укус комара (*Culex pipiens)*. Возбудителем ЛЗН является вирус Западного Нила (ВЗН) — одноцепочечный РНК-вирус, который принадлежит к семейству *Flaviviridae*, роду *Orthoflavivirus*. Вспышки ЛЗН происходят с непредсказуемыми масштабами и локализацией. При этом на сегодняшний день не существует зарегистрированных специфических средств для профилактики и терапии ЛЗН [1].

На сегодняшний день для оценки протективной эффективности профилактических и терапевтических препаратов в мире применяются несколько моделей ЛЗН у животных: мышей, сирийских хомячков, кроликов, реже используют других животных. У этих животных заболевание протекает с различной степенью тяжести, что позволяет оценить патологические признаки вирусной инфекции и оценить уровень репликации вируса. Однако при заражении большинством штаммов ВЗН не наблюдается гибель этих модельных животных [2, 3].

Для оценки эффективности профилактических препаратов необходимо продемонстрировать формирование протективного иммунитета у животных при заражении летальной дозой патогена различных штаммов. К летальным моделям ЛЗН относят трансгенных мышей с нокаутным геном интерферонового рецептора (Ifnar1 KO), основным ограничением которых является доступность. Для получения более доступной летальной модели ЛЗН у животных нами были использованы мыши линии C57BL/6 с индуцированной иммуносупрессией. Для индукции иммуносупрессии применяли дексаметазон (DEX — синтетический глюкокортикоид) и циклофосфамид (CPA — цитостатический противоопухолевый химиотерапевтический лекарственный препарат алкилирующего типа действия). В предыдущих исследованиях нами было продемонстрировано влияние данных препаратов на показатели общего анализа крови животных как по отдельности, так и в комбинации. По результатам исследования было продемонстрировано снижение абсолютного количества лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов в цельной крови животных, получающих комбинированную иммуносупрессию [4].

В течение 7 дней до заражения мышам линии C57BL/6 вводили DEX в дозе 10 мг/кг, за 3 дня до заражения — CPA в дозе 150 мг/кг, за 1 день до заражения — CPA в дозе 100 мг/кг. Препараты использовали как по отдельности, так и в комбинации. Животных заражали ВЗН генотипами 1, 2 и 4 внутрибрюшинно в дозе 10^2 $TCID_{50}$ на животное. Признаками развития инфекции считали уменьшение массы тела и гибель животных.

По результатам исследования было продемонстрировано, что только при заражении животных с комбинированной иммуносупрессией всеми исследуемыми генотипами ВЗН наблюдали 100%-ю гибель животных с 9-го

© А. А. Илюхина, И. Д. Зорков, Д. М. Гроусова, Е. В. Коробова, О. В. Зубкова, И. В. Должикова, 2025

по 16-й день после заражения, а также необратимое снижение веса. При использовании только DEX в качестве иммуносупрессанта не наблюдали гибели после заражения ВЗН генотипом 1, в то время как при заражении генотипами 2 и 4 погибали 20–60 % зараженных животных. При использовании только CPA в качестве иммуносупрессанта детектировали гибель 20 % животных, зараженных ВЗН генотипом 1; 100 % животных, зараженных ВЗН генотипом 2, и 60 % животных, зараженных ВЗН генотипом 4. Лишь 20 % животных, не получающих терапию иммуносупрессантами, погибли при заражении ВЗН генотипами 1 и 2. Гибель контрольных незараженных животных не наблюдали.

Таким образом, нами было продемонстрировано, что заражение мышей линии C57BL/6 с комбинированной иммуносупрессией наиболее распространенными в РФ генотипами ВЗН приводит к развитию тяжелой формы ЛЗН со значительным снижением веса после заражения и 100%-й гибелью животных. Такая модель доступна и легковоспроизводима, что позволяет применять ее для исследования протективной эффективности кандидатных препаратов для терапии и профилактики ЛЗН. Различные модели вирусных инфекции у животных с комбинированной иммуносупрессией на сегодняшний день широко применяются в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ в различных исследованиях.

С использованием разработанной модели ЛЗН у мышей с индуцированной иммуносупрессией была показано, что кандидатная векторная вакцина для профилактики ЛЗН, разработанная в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ, защищает 100 % животных от летальной инфекции, вызванной ВЗН генотипами 1, 2 и 4. На сегодняшний день продолжаются доклинические исследования кандидатной векторной вакцины для профилактики ЛЗН.

Литература

1. Habarugira G., Suen W.W., Hobson-Peters J. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications // Pathogens. 2020. Vol. 9 (7). P. 589.

2. Ben-Nathan D., Porgador A., Yavelsky V., Rager-Zisman B. Models of West Nile virus disease // Drug Discovery Today: Disease Models. 2006. Vol. 3 (1). P. 49–54.

3. Byas A. D., Ebel G. D. Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals // Pathogens. 2020. Vol. 9 (1). P. 48.

4. Гроусова Д. М. Оценка эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-COV-2 на экспериментальных моделях: дисс. … канд. биол. наук: 3.2.7 «Иммунология». М., 2025. 160 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-204

СЛЕПНИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВЕКТОРЫ АРБОВИРУСОВ: МЕТАГЕНОМИКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ

HORSEFLIES AS POTENTIAL ARBOVIRUS VECTORS: METAGENOMIC SCREENING AND EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF VIRAL REPLICATION

А. С. Калянова, М. Н. Гаджикурбанов, А. Г. Литов, Г. Г. Карганова

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

A. S. Kalyanova, M. N. Gadzhikurbanov, A. G. Litov, G. G. Karganova

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

✉ annakalyanova@bk.ru

Аннотация

Несмотря на значительный прогресс в изучении виромов кровососущих членистоногих, слепни остаются в целом недостаточно изученными как потенциальные переносчики арбовирусов. Мы собрали несколько видов слепней на территории России и использовали современные метагеномные технологии и традиционные вирусологические методы для обнаружения и изучения новых вирусов. Мы представляем комплексный анализ виромов слепней с использованием интегрированных методов.

Abstract

While virome research of blood-feeding arthropods has progressed significantly, tabanids remain mostly undercharacterized as potential arbovirus vectors. We collected several species of horseflies on Russia's territory and used next-generation metagenomics and traditional virological methods to detect and study novel viruses. We report comprehensive analysis of horsefly viromes using integrated methods.

До настоящего времени вироm слепней, обитающих на территории России, не подвергался тщательному анализу, в отличие от виромов комаров и клещей. Высокая численность слепней в отдельных регионах, их характер питания и способность механически переносить патогены, делают слепней интересными объектами для поиска новых вирусов двукрылых, а также вирусов, потенциально опасных для животных и человека.

Целью работы является выявление и попытка изоляции вирусов слепней, собранных в Приморском Крае и Рязанской области.

В работе использовали слепней, принадлежащих родам *Hybomitra, Haematopota, Chrysops* и *Tabanus*, собранных в Приморском крае и Рязанской области в 2021 г. Особей индивидуально гомогенизировали и гомогенат собирали в пулы, в результате чего из 61 слепня было сформировано 10 пулов. Затем была выделена тотальная РНК и удалена рРНК. Полученный материал был использован для секвенирования на приборе Illumina. Полученные прочтения были отфильтрованы по длине и качеству программой Trimmomatic v0.39. Фильтрованные чтения использовали для сборки конгитов *de novo* программой SPAdes 3.13.0 (модуль — rnaviral). В контигах проводили поиск вирусов с использованием алгоритма blastn пакета BLAST v2.9.0+ и базы данных nt. Для вирусов с полной кодирующей последовательностью проводили филогенетический анализ при помощи программы phyML

Чтобы оценить потенциальную способность вирусов к репродукции, использовали клеточные культуры млекопитающих (СПЭВ — клетки почки эмбриона свиньи) и членистоногих (С6/36 — клетки комара *Aedes albopictus*; HAE/CTVM8 — культура клеток клещей *Hyalomma anatolicum*; S2 — клетки плодовой мухи *Drosophila melanogaster*). Отфильтрованной суспензией слепней заражали линии клеток и провели 3 пассажа на СПЭВ и С6/36, затем проверив наличие вирусной РНК с помощью ПЦР. Для культур HAE/CTVM8 и S2 была проведена хроническая инфекция. Замена ростовой среды проводилась еженедельно. Культуральную жидкость, полученную от клеток клещей, проверяли с помощью ПЦР с вирусспецифическими праймерами после 3 недель персистенции, а от клеток мухи — после 6 недель. Результаты ПЦР детектировали с помощью электрофореза в агарозном геле и подтверждали секвенированием полученного ДНК-фрагмента методом Сэнгера.

Анализ проведенного высокопроизводительного секвенирования выявил новый вариант BSRV (Big Soux River virus) и 30 новых вирусных последовательностей. Все они близки к различным РНК-вирусам, обнаружен-

© А. С. Калянова, М. Н. Гаджикурбанов, А. Г. Литов, Г. Г. Карганова, 2025

ных другими исследователями в метагеномах насекомых, и родственны семействам *Iflaviridae, Solinviviridae, Permutotetraviridae, Dicistoviridae, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Narnaviridae, Solemoviridae*, родам *Orthophasmavirus, Anphevirus,* группе Negevirus и порядку *Ghabrivirales*.

Из 31 вируса нами было детектировано 17 в одной или нескольких клеточных линиях. Из них 15 вирусов детектировались после 3 недель персистенции в культуре клеток клещей HAE/CTVM8, 5 — после 6 недель персистенции в культуре клеток плодовой мухи S2, 11 — после 3 пассажей в культуре клеток комаров C6/36 и 9 в культуре клеток млекопитающих СПЭВ. Факт детекции этих вирусов в клетках почки эмбриона свиньи представляет интерес, однако мы считаем, что 3 пассажа недостаточно, чтобы говорить об их потенциальной патогенности для позвоночных.

Проделанная работа описывает биоразнообразие вирусов в слепнях из различных регионов России, а также расширяет современные представления о вирусном разнообразии у кровососущих двукрылых. В ходе исследования мы подошли к вопросу изоляции и характеристики вирусов комплексно, используя широкий спектр клеточных культур как членистоногих, так и млекопитающих. Применение различных клеточных линий создало основу для последующего изучения механизмов межвидовой передачи выявленных вирусов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-205

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКИНОВ, ФАКТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И НЕЙРОТРОПНЫХ ФАКТОРОВ В ТКАНЯХ МОЗГА У ПОТОМСТВА МЫШЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГРИППА А *

THE EXPRESSION OF CYTOKINES, INFLAMMATORY AND NEUROTROPHIC FACTORS IN BRAIN TISSUES OF OFFSPRING FROM INFLUENZA A VIRUS-INFECTED MICE

В. В. Киренская[1], А. А. Ложков[1,2], А. В. Гаршинина[2], Я. А. Забродская[1,2], А. В. Васин[1,2]

[1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
[2]НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург

V. V. Kirenskaya[1], A. A. Lozhkov[1,2], A. V. Garshinina[2], Y. A. Zabrodskaya[1,2], A. V. Vasin[1,2]

[1]Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
[2]Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg

✉ samsagirlshrek@gmail.com

Аннотация

Инфицирование вирусом гриппа А (ВГА) в ходе беременности характеризуется повышенной летальностью у матерей и потомства и повышенным риском нейроонтогенетических нарушений [1]. Причиной может являться избыточная продукция цитокинов в развивающейся центральной нервной системе (ЦНС) [2]. По этой причине для исследования механизмов влияния гриппозной инфекции на формирование ЦНС развивающегося плода нужны модели на животных.

Abstract

Infection with influenza A virus during pregnancy is associated with increased mortality in mothers and offspring, as well as an elevated risk of neurodevelopmental disorders [1]. This may be caused by excessive cytokine production in the developing central nervous system (CNS) [2]. Therefore, animal models are needed to investigate the mechanisms by which influenza infection affects fetal CNS development.

Цель работы заключалась в оценке уровня экспрессии цитокинов, факторов воспаления и нейротрофических факторов в тканях гиппокампа и мозга с извлеченным гиппокампом у потомства мышей линии C57BL/6, зараженных на 14-й день беременности вирусом гриппа A/WSN/1933 (H1N1) или A/California/07/09 ((H1N1)pdm09).

В задачи исследования входили:

1) оценка летальности у инфицированных ВГА беременных самок и их потомства;

2) оценка уровня экспрессии мРНК цитокинов (*Il1β, Il6, Ifn-γ, Tnf-α*), фактора воспаления (*iNos-2*), нейротрофического фактора *Bdnf* и фактора дифференцировки нейронов *Sox-2* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в тканях гиппокампа и мозга с извлеченным гиппокампом.

Результаты

Заражение ВГА беременных мышей проводилось интраназально, под легкой эфирной анестезией. В качестве отрицательного контроля использовали беременных самок линии C57BL/6, которым вместо вирусной суспензии вводили препарат плацебо (PBS).

Инфицирование ВГА сопровождалось значительной смертностью у беременных самок по сравнению с контрольной группой. Так, при заражении штаммом H1N1 наблюдалось снижение выживаемости (40 %) по сравнению со штаммом (H1N1)pdm09 (65 %) (рис. 1, *а*).

Среди потомства от инфицированных ВГА мышей наблюдалась значительная смертность по сравнению с контрольной группой. В группе, зараженной штаммом (H1N1)pdm09, выживаемость составляла около 50 %; в группе инфицированных H1N1 мышей — не более 20 % (см. рис. 1, *б*).

Для оценки наличия воспалительных процессов в мозге и их предполагаемой связи с нейродегенеративными заболеваниями у новорожденных мышат отбирали гиппокамп и мозг с извлеченным гиппокампом. Оценка уровня экспрессии цитокинов и факторов воспаления в тканях гиппокампа новорожденных мышат показала возрастание уровня экспрессии мРНК *Il-1β*, *Ifn-γ*, *iNos* при инфицировании матерей штаммом H1N1. В тканях мозга с извлеченным гиппокампом был повышен уровень мРНК *Il-1β* и *iNos*. У потомства инфицированных (H1N1)pdm09 мышей была повышена экспрессия гена *Il-6* в тканях гиппокампа и мозга с извлеченным гиппокампом (рис. 2).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSEG-2023-0014).

© В. В. Киренская, А. А. Ложков, А. В. Гаршинина, Я. А. Забродская, А. В. Васин, 2025

Уровень экспрессии мРНК генов нейротрофического фактора *Bdnf* и фактора дифференцировки нейронов *Sox-2* достоверно не менялся.

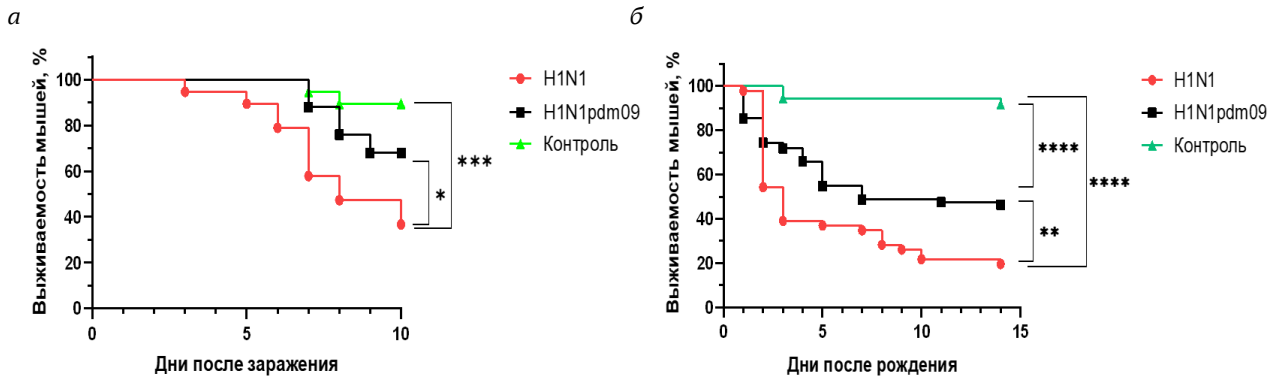


Рис. 1. Динамика гибели беременных мышей с экспериментальной гриппозной пневмонией, вызванной вирусом гриппа (H1N1)pdm09, H1N1 и здоровых мышей (*а*); динамика гибели новорожденных мышат, рожденных от матерей, зараженных вирусом гриппа (H1N1)pdm09 или H1N1, и здоровых мышей (*б*). Статистическая значимость различий между группами была определена по критерию Мантеля — Кокса, с поправкой Бонферрони для множественных попарных сравнений: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$

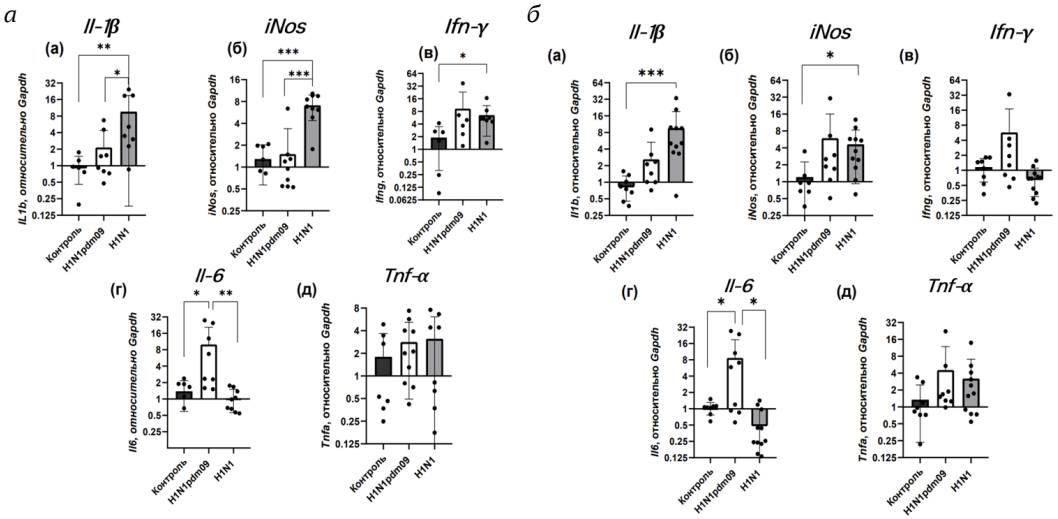


Рис. 2. Анализ экспрессии мРНК *Il-1b* (*а*), *iNos* (*б*), *Ifn-γ* (*в*), *Il-6* (*г*), *Tnf-α* (*д*): *а* — в гиппокампе; *б* — мозге с извлеченным гиппокампом новорожденных мышей. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$. Статистическая значимость различий была определена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с поправкой на множественное сравнение (тест Тьюки)

Выводы

Полученные на мышиной модели инфекции результаты позволяют предполагать, что вирус-индуцированные изменения в иммунной системе матери индуцируют экспрессию провоспалительных цитокинов и факторов воспаления в центральной нервной системе плода, в частности в гиппокампе. С учетом ключевой роли гиппокампа в нейрогенезе, синаптической пластичности и формировании когнитивных функций его повышенная чувствительность к воспалительным процессам может объяснять долгосрочные нейроонтогенетические нарушения у потомства при инфицировании ВГА материнского организма.

Литература

1. Egorova M., Egorov V., Zabrodskaya Y. Maternal influenza and offspring neurodevelopment // Curr. Issues Mol. Biol. 2024. Vol. 46, No. 1. P. 355–366.

2. Fatemi S.H. et al. The effects of prenatal H1N1 infection at E16 on FMRP, glutamate, GABA, and reelin signaling systems in developing murine cerebellum // J. Neurosci. Res. 2017. Vol. 95, No. 5. P. 1110–1122.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-206

ТРЕХВАЛЕНТНАЯ МРНК-ВАКЦИНА ПРОТИВ СЕЗОННОГО ГРИППА *

TRIVALENT MRNA VACCINE AGAINST SEASONAL INFLUENZA

С. И. Красникова, С. В. Шарабрин, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко

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

S. I. Krasnikova, S. V. Sharabrin, A. P. Rudometov, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ sveta.krasnikova2000@yandex.ru

Аннотация

Создание мРНК-вакцин, способных быстро адаптироваться к новым штаммам сезонного гриппа, становится ключевым для эффективной вакцинации. Исследования показывают, что мРНК-вакцины обеспечивают быструю и мощную реакцию иммунной системы. Полученная в настоящей работе трехвалентная мРНК-вакцина, доставленная с помощью липидных наночастиц способна вызывать специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ против сезонного гриппа.

Abstract

The development of mRNA vaccines that can quickly adapt to new strains of seasonal influenza is becoming key to effective vaccination. Studies show that mRNA vaccines provide a rapid and powerful response of the immune system. The trivalent mRNA vaccine obtained in this work, delivered using lipid nanoparticles, is capable of inducing a stable humoral and cellular immune response against seasonal influenza.

Одним из наиболее перспективных подходов к созданию вакцин против сезонного гриппа является создание вакцин на основе мРНК. Этот метод позволяет быстро заменять целевой ген, предлагает недорогое производство, гибкость разработки и активирует как клеточный и гуморальный иммунитет. В настоящее время мРНК-вакцины против гриппа находятся на разных стадиях доклинических испытаний, что делает разработку эффективных трехвалентных мРНК-вакцин актуальной задачей.

Вакцины на основе мРНК получают из линеаризованной ДНК-матрицы в результате транскрипции *in vitro*. Для нормального функционирования мРНК должна быть идентичной клеточной мРНК, для этого ей необходимы следующие структурные элементы: кэп на 5′-конце, нетранслируемые области, поли (А)-хвост на 3′-конце. Для улучшения свойств мРНК включают модифицированные основания, например N1-метил-псевдоуридин (mΨ), что позволит снизить цитотоксическую активность и подавить активацию неспецифического иммунного ответа.

Цель исследования — разработать и получить трехвалентную мРНК-вакцину против сезонного гриппа.

В качестве матриц для синтеза мРНК использовались плазмидные ДНК, кодирующие белок гемагглютинина вируса гриппа А (H1N1), (H3N2) и В/Виктория. Плазмида имеет в своей структуре Т7 промотор, 5′- и 3′-НТО β-глобина человека, а также встроенный поли(А)-хвост. Подготовка матриц для синтеза РНК включала в себя линеаризацию плазмид по сайту гидролиза bso31I [1].

Получение мРНК было проведено с использованием набора для синтеза мРНК *in vitro* («БиоЛабМикс», Новосибирск, Россия) согласно методике производителя с включением аналога кэпа того же производителя и модифицированного нуклеотида mΨ (N1-метил-псевдоуридин). Таким образом, было получено 3 варианта мРНК, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа *A/Wisconsin/67/2022 (H1N1) pdm09*, *A/Darwin/9/2021(H3N2)* и *B/Austria/1359417/2021*.

Чтобы оценить эффективность экспериментальной трехвалентной мРНК вакцины против сезонного гриппа, проводили двухкратную иммунизацию мышей линии BALB/c. Для этого была использована 1 группа с 6 животными. По 10 мкг каждого варианта мРНК заворачивали в липидные наночастицы (ЛНП) по методике, описанной в работе [2]. Иммунизация проводилась с интервалом в 2 недели с последующим анализом гуморального, вируснейтрализующего и клеточного иммунного ответа.

В результате работы было показано, что иммунизация трехвалентной мРНК вакциной мышей линии BALB/c индуцирует синтез специфических антител к гемагглютинину, обладающих вируснейтрализующей активностью против вирусов гриппа *A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1), A/Darwin/9/2021(H3N2)* и *B/Austria/1359417/2021*.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 25/21.

© С. И. Красникова, С. В. Шарабрин, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2025

Для определения клеточного иммунитета методом ELISpot измеряли количество спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию HA-специфическими пептидами. Результат Т-клеточного ответа составил 253 на 1 млн клеток, секретирующих IFN-γ.

Таким образом, разработанная трехвалентная мРНК вакцина может способствовать формированию специфического иммунного ответа против сезонного гриппа у мышей и является перспективным кандидатом в качестве вакцины против сезонного гриппа.

Литература

1. Шарабрин С. В., Ильичев А. А., Кисаков Д. Н. и др. Безыгольная струйная мРНК-вакцина, кодирующая гемагглютинин гриппа A(H1N1) pdm09, защищает мышей от смертельной вирусной инфекции // Молекулярная биология. 2025. Т. 59. С. 376–389.

2. Kisakov D. N., Karpenko L. I., Kisakova L. A. et al. Jet Injection of Naked mRNA Encoding the RBD of the SARS-CoV-2 Spike Protein Induces a High Level of a Specific Immune Response in Mice // Vaccines. 2025. Vol. 13. P. 65.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-207

АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНОЙ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ ВИРУСА СЕНДАЙ, ПРОТИВ РАЗНЫХ ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 *

ACTIVITY OF ANTIBODIES INDUCED BY A RECOMBINANT INTRANASAL VACCINE BASED ON SENDAI VIRUS AGAINST DIFFERENT VARIANTS OF SARS-COV-2

Г. А. Кудров, С. С. Зайнутдинов, И. С. Шульгина, А. В. Зайковская, А. А. Сергеев, Г. В. Кочнева

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

G. A. Kudrov, S. S. Zainutdinov, I. S. Shulgina, A. V. Zaykovskaya, A. A. Sergeev, G. V. Kochneva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ g16kud@gmail.com

Аннотация

На основе вируса Сендай штамма Москва разработана вакцинная конструкция Sen-S-JN.1(M), которая экспрессирует полноразмерный белок spike (S) циркулирующего варианта JN.1 SARS-CoV-2. На модели мышей линии BALB/c показано, что однократная интраназальная вакцинация Sen-S-JN.1(M) индуцирует формирование высоких титров вируснейтрализующих антител как к гомологичному варианту JN.1, так и к ряду других циркулирующих вариантов SARS-CoV-2.

Abstract

A vaccine construct Sen-S-JN.1(M), which expresses the full-length spike (S) protein of SARS-CoV-2 variant JN.1, was developed based on Sendai virus strain Moscow. Using the BALB/c mice model, it was shown that a single intranasal vaccination with Sen-S-JN.1(M) induces high titers of virus-neutralizing antibodies not only against the homologous JN.1 variant but also against several other circulating variants of SARS-CoV-2.

В заявлении ВОЗ от 15 мая 2025 г. указано, что моновалентные вакцины на основе варианта JN.1 SARS-CoV-2 являются актуальными для профилактики COVID-19 [1]. JN.1, относящийся к линии Омикрона, выделен в конце 2023 г. и быстро стал доминирующим штаммом во многих странах, включая Россию. Его отличает высокая контагиозность, обусловленная мутацией L455S в S-белке, усиливающей связывание с ACE2-рецептором [2]. Несмотря на отсутствие повышенной тяжести заболевания, широкое распространение JN.1 создает дополнительную нагрузку на систему здравоохранения.

Поскольку заражение SARS-CoV-2 происходит преимущественно через дыхательные пути, интраназальная иммунизация является важной стратегией для формирования мукозального иммунитета. Перспективным подходом являются живые векторные вакцины на основе непатогенных респираторных вирусов, способные индуцировать комплексный иммунный ответ при однократном введении.

Вирус Сендай (SeV) обладает рядом преимуществ как вакцинный вектор: он безопасен для человека, стабилен генетически и эффективно стимулирует иммунитет [3]. Кроме того, SeV является мощным индуктором интерферона, обеспечивая неспецифическую противовирусную защиту.

Цель работы — создать и охарактеризовать рекомбинантную интраназальную вакцину на основе штамма Москва вируса Сендай, экспрессирующую S-белок варианта JN.1 SARS-CoV-2, а также оценить ее иммуногенность и перекрестную нейтрализующую активность в отношении других вариантов коронавируса.

Рекомбинантный вариант Sen-S-JN.1(M) был сконструирован с использованием ранее созданного набора из четырех плазмидных ДНК, три из которых экспрессируют гены N, P и L вируса Сендай (штамм Москва), а четвертая — геномная плазмида pSen2-MCS(M), содержащая сайт для вставки трансгена между генами P и M. После трансфекции в клетках 293-T7 вирус «оживляли» в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов и очищали.

Методом иммуноблоттинга было показано, что S-белок SARS-CoV-2 эффективно экспрессируется в клетках, инфицированных Sen-S-JN.1(M), а также включается в рекомбинантные вирионы в виде полноразмерной (~ 250 кДа) и расщепленной (S1/S2) форм. Обнаружено наличие трехмерной конформации белка, что указывает на корректное формирование антигенной структуры.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 37/21).

© Г. А. Кудров, С. С. Зайнутдинов, И. С. Шульгина, А. В. Зайковская, А. А. Сергеев, Г. В. Кочнева, 2025

Однократное интраназальное введение Sen-S-JN.1(M) мышам линии BALB/c (n = 10) индуцировало гуморальный иммунный ответ через 28 дней после вакцинации. Уровень общих IgG к SARS-CoV-2 в ИФА составил 10026 (средний геометрический титр, СГТ), нейтрализующие антитела (HT_{50}) достигли СГТ 279 против варианта JN.1.

Анализ перекрестной нейтрализующей активности выявил значительное снижение титров против вариантов Delta, BA.1, XBB.1.5 и EG.5.1 (HT_{50} < 10, p < 0,0001). Умеренное снижение активности наблюдалось в отношении Wuhan и BA.5.2, кратность снижения нейтрализующих титров относительно JN.1 составила 10,6 и 8,6 соответственно. Наиболее высокий уровень перекрестной нейтрализации (кратность снижения 2,3) зарегистрирован против варианта XBB.1.16.

Эти данные подчеркивают важность учета антигенной дистанции между вакцинным и циркулирующим штаммами при разработке новых вакцин. Тем не менее вакцина Sen-S-JN.1(M) показала высокую иммуногенность и потенциальную защитную эффективность против ряда современных вариантов SARS-CoV-2 (BA.5.2, XBB.1.16).

Таким образом, сконструированный нами рекомбинантный вариант вируса Сендай штамма Москва Sen-S JN.1(M) эффективно экспрессирует трансген S белка варианта JN.1 SARS-CoV-2 и экспонирует его на поверхности вирионов, что обеспечивает индукцию гуморального иммунного ответа при однократной интраназальной вакцинации. Полученные результаты подтверждают высокую иммуногенность разработанной интраназальной вакцины и ее потенциал для обеспечения перекрестной защиты от циркулирующих и эволюционно близких вариантов SARS-CoV-2.

Литература

1. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines // World Health Organization. 2025. URL: https://www.who.int/news/item/15-05-2025-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines (accessed: 15.05.2025).

2. Lu Y., Ao D., He X., Wei X. The rising SARS-CoV-2 JN.1 variant: Evolution, infectivity, immune escape, and response strategies // MedComm. 2024. Vol. 5. Art. e675. URL: https://doi.org/10.1002/mco2.675 (accessed: 15.05.2025).

3. Kochneva G.V., Kudrov G.A., Zainutdinov S.S. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a single intranasal dose vectored vaccine based on Sendai virus (Moscow strain) against SARS-CoV-2 variant of concern // Vaccines. 2024. Vol. 12, No. 7. Art. 783. URL: https://doi.org/10.3390/vaccines12070783 (accessed: 15.05.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-208

СИНТЕЗ КОНФОРМАЦИОННО ЗАМКНУТЫХ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А

SYNTHESIS OF CONFORMATIONALLY LOCKED PHOSPHORYLGUANIDINE OLIGONUCLEOTIDES AND INVESTIGATION OF THEIR ACTIVITY AGAINST INFLUENZA A VIRUS

П. К. Ляпин[1,3], Е. С. Дюдеева[2], И. Р. Иматдинов[3]

[1]Новосибирский государственный университет
[2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
[3]Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

P. K. Lyapin[1,3], E. S. Dyudeeva[2], I. R. Imatdinov[3]

[1]Novosibirsk State University
[2]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
[3]State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ lyapin_pk@vector.nsc.ru

Аннотация

Высокая изменчивость вируса гриппа А приводит к появлению новых вариантов, менее восприимчивых к противовирусным препаратам [1]. В связи с этим актуальна разработка новых терапевтических стратегий, в частности перспективна антисмысловая технология. В работе описаны конформационно замкнутые фосфорилгуанидиновые (PG-LNA) олигонуклеотиды — новый тип модифицированных аналогов ДНК, сочетающих повышенное сродство к РНК-мишеням и устойчивость к нуклеазам.

Abstract

The high variability of the influenza A virus leads to the emergence of new variants that are less susceptible to antiviral drugs [1]. In this regard, the development of new therapeutic strategies is relevant, in particular, antisense technology is promising. The paper describes conformationally locked phosphorylguanidine (PG-LNA) oligonucleotides, a new type of modified DNA analogues combining increased affinity for target RNAs and resistance to nucleases.

Грипп — острая респираторная инфекция, вызываемая РНК-содержащими вирусами с выраженной эпидемической и пандемической активностью. Особую опасность представляют зоонозные и зооантропонозные варианты (A/H5N1, A/H7N9), способные преодолевать межвидовые барьеры благодаря высокой антигенной изменчивости [2]. В настоящем исследовании с использованием биоинформатических методов подобраны PG-LNA-модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на относительно консервативные регионы сегментов генома вируса гриппа А. Произведен химический синтез олигонуклеотидов, в экспериментах *in vitro* показана их ингибирующая активность в отношении модельного рекомбинантного вируса гриппа А при сохранении пролиферативной активности клеток HEK293T.

Материалы и методы

На первом этапе проведен биоинформатический анализ генома прототипного штамма A/PR/8 (H1N1) «дикого типа» с идентификацией консервативных участков и расчетом свободной энергии вторичной структуры РНК, на основании которого подобраны 50 комплементарных антисмысловых олигонуклеотидов. На втором этапе осуществлен синтез нативных и конформационно замкнутых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (LNA-гапмеры, PG-гапмеры, PG-LNA гапмерные аналоги и PG-LNA аналоги с равномерным распределением PG-групп), часть из которых исследована в экспериментах *in vitro* на цитотоксическое действие и ингибирующую активность в отношении рекомбинантного генетически маркированного вируса на основе лабораторного штамма *A/PR/8 (H1N1), обеспечивающего экспрессию гена зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen при проникновении и репродукции в пермиссивных клетках. Предварительную оценку цитотоксического действия нативных и модифицированных олигонуклеотидов на клетки линии HEK293T проводили методом изучения жизнеспособности и пролиферативной активности клеток, основанным на анализе флуоресцентного сигнала красителя AlamarBlue (метаболическое превращение нетоксичного водорастворимого резазурина во флуоресцентное производное ве-

© П. К. Ляпин, Е. С. Дюдеева, И. Р. Иматдинов, 2025

щество резоруфин) при измерении флуоресценции через 24 и 48 ч после обработки. Исследование ингибирующей активности синтезированных олигонуклеотидов на культуре клеток HEK293T осуществляли в ходе анализа подавления экспрессии репортерного гена mNeonGreen и при оценке ингибирования формирования флуоресцирующих бляшек.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования продемонстрировали выраженную, но кратковременную (до 24 ч) ингибирующую активность нативных олигонуклеотидов в отношении вируса гриппа А, что подтверждалось снижением формирования флуоресцирующих бляшек в клеточном монослое. Для преодоления ограничений, связанных с быстрой деградацией немодифицированных соединений, была разработана серия PG-LNA-модифицированных аналогов, которые показали повышенную устойчивость к нуклеазам и сродство к РНК-мишеням благодаря гапмерной архитектуре, обеспечивающей образование стабильных дуплексов с вирусной РНК и последующую потенциальную активацию внутриклеточной РНКазы Н.

Установлена четкая корреляция между степенью модификации и цитотоксичностью: комбинированные PG-LNA аналоги снижали жизнеспособность клеток до 65,1 %, однако не нарушали их последующую пролиферативную активность. При этом PG-LNA гапмерные аналоги эффективно подавляли экспрессию репортерного гена nNeonGreen с практически полным подавлением роста флуоресцентных бляшек.

Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшей разработки антисмысловой терапии с применением конформационно замкнутых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов. Ключевыми направлениями будущих исследований станут подтверждение ингибирующего действия в экспериментах *in vitro* в отношении панели других лабораторных вариантов вируса гриппа А, точное определение цитотоксической ($ЦД_{50}$) и ингибирующей ($ИД_{50}$) доз, терапевтического индекса (ТИ), что позволит объективно оценить потенциал и подобрать структуру химически модифицированных олигонуклеотидов для создания прототипных средств специфической терапии на основе антисмысловой технологии.

Литература

1. Hujatullah M., Rabani N. G. Influenza virus genetic diversity and epidemiological profile in human population // Exp. Biol. (1563-0218). 2024. Vol. 101, No. 4.

2. Hui X. et al. A Review of Cross-Species Transmission Mechanisms of Influenza Viruses // Veterinary Sci. 2025. Vol. 12, No. 5. P. 447.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-209

АНАЛИЗ ВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКИ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА *

TEMPORAL DYNAMICS OF NATURAL RECOMBINATION IN FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

М. М. Маличава[1], Ю. А. Алешина[1,2]

[1] *Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Сеченовского университета, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

M. M. Malichava[1], Y. A. Aleshina[1,2]

[1] *Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ mate_malichava@mail.ru

Аннотация

Вирус ящура является патогеном сельскохозяйственных животных и приводит к серьезным экономическим потерям. Появление новых линий вируса ящура, в том числе панзоотических, связывают с гомологической рекомбинацией. В работе был проведен анализ закономерностей рекомбинации и определено время жизни рекомбинантных форм вируса ящура с использованием всех доступных последовательностей генома.

Abstract

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a pathogen that infects cattle and causes severe economic losses. The emergence of new panzootic FMDV strains is associated with homologous recombination — one of the key mechanisms contributing to the virus genetic diversity. In this study, we analyzed patterns of natural recombination in FMDV using all available complete genome sequences.

Вирус ящура — это небольшой безоболочечный вирус с (+)-РНК-геномом, который относится к семейству *Picornaviridae* и вызывает высококонтагиозное заболевание сельскохозяйственных животных — ящур [1]. Важную роль в эволюции вируса ящура и других РНК-вирусов играет гомологичная рекомбинация. Рекомбинация может приводить к появлению рекомбинантных форм — новых циркулирующих линий вирусов. Появление таких панзоотических линий вируса ящура, как O/ME-SA/PanAsia и O/ME-SA/Ind-2001, связывают с рекомбинацией [2, 3]. Важной характеристикой динамики рекомбинации является время жизни рекомбинантных форм. Для энтеровирусов и норовирусов медианное время жизни известно и составляет от 3 до 11 лет [4, 5], а для вируса ящура частота рекомбинации остается неизвестной.

Для анализа использовались все доступные нуклеотидные последовательности вируса ящура, депонированные в базе данных NCBI Nucleotide (N = 1485). С помощью методов детекции рекомбинации, реализованных в программе RDP4 [6], были определены события рекомбинации на уровне всего вида *Aphtovirus vesiculae* и его отдельных серотипов. Как и было показано ранее [2, 7, 8], горячие точки рекомбинации находятся на границах регионов L-P1 (в области VP4) и P1-P2 (в области 2A), а в регионах, кодирующих лидерную протеазу, белки VP3, 3A, 3B, 3C и РНК-зависимую РНК-полимеразу, рекомбинация практически отсутствует. Иными словами, геномы вируса ящура рекомбинируют блоками структурных и неструктурных регионов. При этом у всех серотипов, кроме SAT2, рекомбинация на границе P1-P2 происходит чаще, чем на границе L-P1. Чаще всего в рекомбинации участвуют европейско-азиатские серотипы O, Asia1 и A. Южноафриканские серотипы рекомбинируют в основном друг с другом. В серотипах A и O наблюдалась рекомбинация между вирусами разных топотипов, например между топотипами EA-2 (Кения, Уганда) и EA-3 (Эфиопия, Судан) серотипа O.

Для оценки времени жизни рекомбинантных форм были построены филогенетические деревья с разверткой по времени (программа BEAST2 [9]) для участка генома VP2-VP3-VP1, в котором наблюдался наиболее выраженный временной сигнал — зависимость времени выделения изолята от эволюционного расстояния от корня до листа на дереве, построенном по этому участку (TempEst [10], байесовская оценка временного сигнала). Времена жизни рекомбинантных форм определялись как возраста клад, совпадающих на двух филогенетических деревьях. Для оценки различий между деревьями сравнивались их топологии путем сопоставления нетривиаль-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00097).
© М. М. Маличава, Ю. А. Алешина, 2025

ных ветвей с учетом их статистической поддержки. В среднем такие общие клады у вируса ящура, в зависимости от серотипа, существуют от 1 до 5 лет (см. таблицу).

Медианное время жизни рекомбинантных форм вируса ящура

Серотип	Регион 1	Регион 2	Медианное время жизни, годы
Asia1	P1	Lpro	5,8
Asia1	P1	P2	2,7
Asia1	P1	P3	1,5
O	P1	Lpro	6,3
O	P1	P2	7,2
O	P1	P3	6,0
SAT1	P1	Lpro	2,8
SAT1	P1	P2	9,5
SAT1	P1	P3	3

Согласно анализу событий рекомбинации по геному у серотипа Asia1 меньше точек разрыва на границе L-P1 (5 точек), чем на границе P1-P2 (8 точек). Соответственно, рекомбинантные формы, образованные из блоков Lpro и P1, живут дольше, чем образованные из блоков P1 и P2/P3 (см. таблицу). У серотипа O похожая ситуация по рекомбинации, однако значительной разницы в медианном времени жизни рекомбинантных форм, образованных из разных блоков, нет.

В результате анализа всех доступных полногеномных последовательностей вируса ящура были охарактеризованы особенности и временная динамика его эволюции. Анализ показал, что в рекомбинации участвуют как вирусы одного серотипа, так и разных. При этом рекомбинация преимущественно происходит на границах функциональных регионов генома, что указывает на возможные биологические ограничения, связанные с жизнеспособностью рекомбинантов. Такая особенность характерна не только для вируса ящура, но и для других пикорнавирусов [11], а также калицивирусов [4]. Впервые было определено медианное время существования рекомбинантных форм вируса ящура, которое составляет от 2 до 9 лет и находится в тех же пределах, что у энтеровирусов и норовирусов.

Литература

1. Grubman M. J., Baxt B. Foot-and-Mouth Disease // Clin. Microbiol. Rev. 2004. Vol. 17, No 2. P. 465–493.

2. Brito B. et al. A traditional evolutionary history of foot-and-mouth disease viruses in Southeast Asia challenged by analyses of non-structural protein coding sequences // Sci Rep. Nat. Publishing Group, 2018. Vol. 8, No. 1.

3. Bachanek-Bankowska K. et al. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage // Sci Rep. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 8, No. 1.

4. Vakulenko Y.A., Orlov A. V., Lukashev A. N. Patterns and Temporal Dynamics of Natural Recombination in Noroviruses // Viruses. MDPI, 2023. Vol. 15, No. 2.

5. McWilliam Leitch E.C. et al. Evolutionary Dynamics and Temporal/Geographical Correlates of Recombination in the Human Enterovirus Echovirus Types 9, 11, and 30 // J. Virol. Am. Soc. Microbiol. 2010. Vol. 84, No. 18. P. 9292–9300.

6. Martin D. P. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // Virus Evol. Oxford Academic, 2015. Vol. 1, No. 1.

7. Fish I. et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Interserotypic Recombination in Superinfected Carrier Cattle // Pathogens. MDPI, 2022. Vol. 11, No. 6. P. 644.

8. Jamal S. M. et al. Evidence for multiple recombination events within foot-and-mouth disease viruses circulating in West Eurasia // Transbound Emerg Dis. Blackwell Publishing Ltd, 2020. Vol. 67, No. 2. P. 979–993.

9. Bouckaert R. et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis // PLoS Comput. Biol. 2019. Vol. 15, No. 4.

10. Rambaut A. et al. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen) // Virus Evol. Oxford Academic, 2016. Vol. 2, No. 1.

11. Muslin C. et al. Recombination in Enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process // Viruses. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 11, No. 9. P. 859.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-210

ЗАМЕЩЕННЫЕ ТЕТРАГИДРОХИНОЛИНЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ОСНОВНОЙ ПРОТЕАЗЫ ВИРУСОВ SARS-COV-2, SARS-COV-1 И MERS-COV

SUBSTITUTED TETRAHYDROQUINOLINES AS PROMISING INHIBITORS OF THE MAIN PROTEASE OF SARS-COV-2, SARS-COV-1 AND MERS-COV VIRUSES

Ю. В. Мешкова[1], М. К. Маренина[1], С. В. Беленькая[1,2], Д. Н. Щербаков[1,2], А. А. Пронина[3], А. П. Санчес-Пиментель[3], Ф. И. Зубков[3], О. И. Яровая[1], М. В. Хвостов[1]

[1]*Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[2]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3]*Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва*

Yu. V. Meshkova[1], M. K. Marenina[1], S. V. Belenkaya[1,2], D. N. Shcherbakov[1,2], A. A. Pronina[3], A. P. Sanchez-Pimentel[3], F. I. Zubkov[3], O. I. Yarovaya[1], M. V. Khvostov[1]

[1]*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*
[2]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[3]*Peoples' Friendship University of Russia named after P. Lumumba, Moscow*

✉ meshkova_29@mail.ru

Аннотация

В работе исследована способность замещенных 1,2,3,4-тетрагидрохинолинов ингибировать основную протеазу вирусов SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 и MERS-CoV. Обнаружены соединения лидеры, имеющие значение IC_{50} в нижнем микромолярном диапазоне концентраций.

Abstract

The ability of substituted 1,2,3,4-tetrahydroquinolines to inhibit the main protease of SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV viruses was investigated in this work. The leader compounds were found to have IC_{50} values in the lower micromolar concentration range.

Пандемия коронавирусной инфекции 2019 г. (COVID-19), вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, привела к миллионам смертей и серьезным социально-экономическим последствиям во всем мире, став важнейшим эпидемиологическим вызовом последнего времени. Несмотря на то что Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о завершении глобальной чрезвычайной ситуации с COVID-19, угроза заражения этим вирусом и вероятность тяжелого течения заболевания остаются актуальными. Вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать среди населения, и его новые мутации, устойчивые к существующим вакцинам, могут спровоцировать новую вспышку заболеваемости [1], что также не исключено для SARS-CoV-1 и MERS-CoV. В связи с этим поиск новых эффективных средств, обладающих активностью против широкого спектра коронавирусов, по-прежнему остается приоритетной задачей для медицинских химиков и вирусологов.

Одной из важных мишеней для ингибирования репликации коронавирусов является основная протеаза (Mpro), также известная как 3-химотрипсиноподобная протеаза (3Clpro) — фермент, участвующий в расщеплении полипротеина коронавируса в одиннадцати участках. На ингибирование 3Clpro направлено действие нирматрелвира, также известного под шифром PF-07321332 — противовирусного препарата, который в комбинации с ритонавиром используется в качестве средства от COVID-19. Применение этого препарата сопровождается побочными эффектами [2] и может привести к возникновению резистентности [3], при этом он является единственным одобренным средством для лечения. Перспективной платформой для поиска новых противовирусных агентов могут служить тетрагидрохинолины, обладающие широким спектром биологической активности.

В рамках настоящей работы было выполнено исследование ингибирующей активности ряда замещенных тетрагидрохинолинов в отношении основных вирусных протеаз (3CLpro) SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS-CoV.

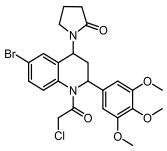
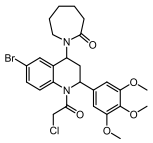
Для оценки способности исследуемых соединений ингибировать 3CLpro использовали IC_{50} — полуингибирующую концентрацию вещества, при которой уровень флуоресценции снижается на 50 % по сравнению

© Ю. В. Мешкова, М. К. Маренина, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, А. А. Пронина, А. П. Санчес-Пиментель, Ф. И. Зубков, О. И. Яровая, М. В. Хвостов, 2025

со значением, полученным без добавления ингибитора. Флуоресценция возникает в результате расщепления пептидного субстрата DabcylKTSAVLQ↓SGFRKME(Edans)NH_2 (CPC Scientific Inc, Китай) протеазой 3CLpro. Сигнал регистрировали на флуориметре SuperMax 3100 (Flash, Китай) при 355 и 460 нм для возбуждения/излучения соответственно в режиме кинетического сканирования.

Было установлено, что 2,4,5-тризамещенные-1,2,3,4-тетрагидрохинолины обладают ингибирующей активностью в отношении основных вирусных протеаз SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS-CoV в нижнем микромолярном и среднем микромолярном диапазоне концентраций соответственно (см. таблицу).

3CLpro-ингибирующая активность соединений в сравнении с нирматрелвиром

Соединение	IC_{50}, μM		
	SARS-CoV-1	SARS-CoV-2	MERS-CoV
	5,13 ± 2,18	2,32 ± 1,17	18,77 ± 3,93
	2,34 ± 0,83	1,39 ± 0,06	37,90 ± 6,94
Нирматрелвир	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,06

Литература

1. Sahoo B. M., Ravi Kumar B. V. et al. Drug Repurposing Strategy (DRS): Emerging Approach to Identify Potential Therapeutics for Treatment of Novel Coronavirus Infection // Front. Mol. Biosci. 2021. Vol. 8. P. 1–11.

2. Hammond J., Leister-Tebbe H. et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19 // New England J. Medicine. 2022. Vol. 386 (15). P. 1397–1408.

3. Duan Y., Zhou H. et al. Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir // Nat. 2023. Vol. 622 (7982). P. 376–382.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-211

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-COV-2, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ 12 СУБЪЕКТОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ *

ANALYSIS OF SARS-COV-2 GENETIC VARIANTS CIRCULATING IN 12 REGIONS OF THE RUSSIAN FEDERATION

М. С. Мокроносов, И. А. Драчкова, К. С. Трубенков, Т. С. Тимохина, Т. В. Трегубчак, М. В. Сивай, С. А. Боднев

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

M. S. Mokronosov, I. A. Drachkova, K. S. Trubenkov, T. S. Timohina, T. V. Tregubchak, M. V. Sivay, S. A. Bodnev

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ Mokronosov_ms@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе представлен анализ полногеномных последовательностей вируса SARS-CoV-2 в биологическом материале, поступившем из 12 регионов Российской Федерации с января 2024 по апрель 2025 г. Определены циркулирующие субварианты, впервые выявленные линии проанализированы на наличие аминокислотных замен, способных изменить биологические характеристики вируса, способствуя его дальнейшему распространению.

Abstract

The paper presents an analysis of the full-genomic sequences of the SARS-CoV-2 virus in samples from 12 regions of the Russian Federation from January 2024 to April 2025, identified circulating subvariants, and analyzed the lines identified for the first time for the presence of amino acid substitutions that can significantly change the characteristics of the virus, contributing to its further spread.

Впервые выявленный в 2019 г. вирус SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в мире. И хотя COVID-19 уже не имеет статуса пандемии, но молекулярно-эпидемиологический мониторинг, направленный на отслеживание циркулирующих и вновь появившихся вариантов, вызывающих тяжелые или летальные случаи заболевания, продолжается в связи с большой значимостью получаемых результатов.

Появление новых мутаций приводит к изменению третичной структуры белков вириона и их функций. Так, одним из самых вариабельных является поверхностный S-белок коронавируса, отвечающий за связывание с рецептором ACE-2 и проникновение внутрь клетки-мишени, и изменение его конформации может приводить к ускользанию от иммунного ответа, выработанного на ранее перенесенную инфекцию или в результате вакцинации. Кроме того, различные сочетания аминокислотных замен по-разному влияют на структуру белков и их функции. Одна замена, появившаяся ранее, может уменьшать связывание S-белка с клеточными рецепторами, в то время как в сочетании с новой мутацией может усиливать тропность вируса к рецептору в несколько раз.

Цель работы — анализ генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, циркулирующих на территории 12 субъектов Российской Федерации (Алтайский край, Кемеровская, Новосибирская, Омская области, Приморский край, Сахалинская, Свердловская, Тюменская области, Хабаровский край, Ханты-Мансийский автономный округ, Челябинская область, Ямало-Ненецкий Автономный округ).

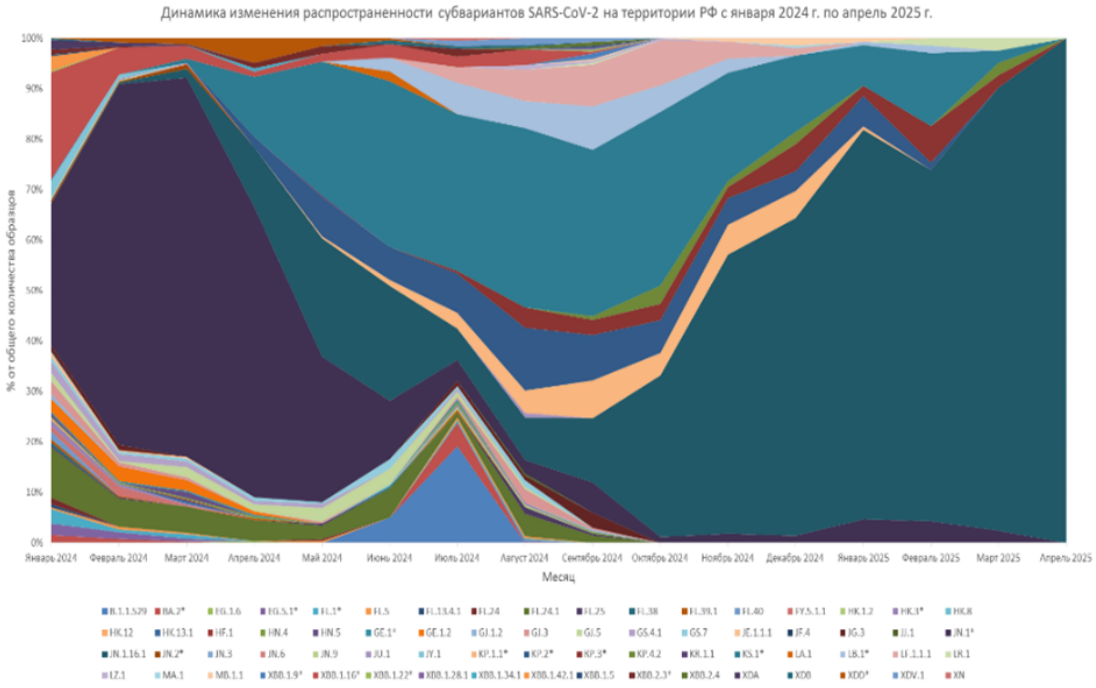
Реакция обратной транскрипции была проведена с помощью набора Реверта L (AmpliSens, Россия). Для наработки коротких фрагментов генома в ходе полимеразной цепной реакции был использован набор олигонуклеотидных праймеров по протоколу ARTIC V.5.3.2. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Illumina MySeq/ISeq. Полученные последовательности были проанализированы на наличие аминокислотных замен и принадлежность к различным субвариантам вируса SARS-CoV-2 с помощью онлайн-сервисов NextStrain и GISAID.

С января 2024 по апрель 2025 г. в 4668 образцах, полученных от госпитализированных пациентов с COVID-19, было обнаружено 136 различных генетических линий SARS-CoV-2. Большинство вновь выявленных субвариантов циркулировали в наблюдаемый период в течение нескольких месяцев (см. рисунок). При этом

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 32/21).

© М. С. Мокроносов, И. А. Драчкова, К. С. Трубенков, Т. С. Тимохина, Т. В. Трегубчак, М. В. Сивай, С. А. Боднев, 2025

количество образцов, содержащих тот или иной вариант, было небольшим, по несколько в месяц. В целом во всех исследованных образцах наиболее часто встречающимися являются линии JN.1 (939 образцов, 20,12 %), JN.1.16.1 (812 образцов, 17,40 %) и KS.1 (627 образцов, 13,43 %).



Динамика распространенности субвариантов SARS-CoV-2 с января 2024 по апрель 2025 г.

В первой половине 2024 г. по регионам наблюдалось различие в генетическом спектре доминирующих вариантов. Так, в Кемеровской области в этот период наиболее распространенным являлся вариант FL.24, в то время как в Ханты-Мансийском автономном округе и Сахалинской области — вариант KS.1. На апрель 2025 г. во всех 12 регионах доминировал вариант JN.1.16.1.

Для впервые выявленных вариантов KP.2, KP.3 и JN.1.18 были обнаружены наиболее значимые аминокислотные замены DelS31, T22N, F59S, Q493E, которые приводят к возникновению дополнительных сайтов гликозилирования S-белка, что снижает аффинность к антителам у переболевших и вакцинированных людей. Однако данные мутации не привели к доминированию этих субвариантов, но их циркуляция на территории регионов Российской Федерации продолжается.

Тем не менее это может свидетельствовать о необходимости продолжения молекулярно-эпидемиологического мониторинга с большим географическим охватом для своевременного обновления разработанных ранее вакцин под впервые выявленные циркулирующие на территории РФ или прогнозируемые к появлению субварианты вируса SARS-CoV-2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-212

АДАПТАЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЦИФРОВОЙ ПЦР ДЛЯ АНАЛИЗА ПРОВИРУСНЫХ РЕЗЕРВУАРОВ У ЛИЦ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ADAPTATION AND APPLICATION OF A DIGITAL PCR–BASED MULTIPLEX SYSTEM FOR ANALYSIS OF PROVIRAL RESERVOIRS IN PEOPLE LIVING WITH HIV IN THE RUSSIAN FEDERATION

А. И. Мурзин, К. А. Елфимов, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова,
Д. П. Зырянова, Л. Г. Готфрид, В. Е. Екушов, М. Р. Халиков

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

A. I. Murzin, K. A. Elfimov, A. V. Totmenin, N. M. Gashnikova,
D. P. Zyryanova, L. G. Gotfrid, V. E. Ekushov, M. R. Halikov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ and.murzin1@gmail.com

Аннотация

Цифровая ПЦР является одним из наиболее перспективных методов оценки эффективности терапевтических вмешательств, направленных на элиминацию провирусных резервуаров и излечение ВИЧ-инфекции. В нашей работе мы адаптировали метод для его реализации среди геновариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации.

Abstract

Digital PCR is one of the most promising methods for assessing the effectiveness of therapeutic interventions aimed at eliminating proviral reservoirs and curing HIV infection. In our work, we adapted the method for its implementation among HIV-1 genovariants circulating in the Russian Federation.

Введение

Персистенция провирусных резервуаров ВИЧ-1 в организме инфицированного человека является главной проблемой на пути к излечению ВИЧ-инфекции [1]. Разрабатываемые терапевтические вмешательства, направленные на элиминацию провирусных резервуаров, требуют точных методов их количественной оценки [2]. Одним из таких методов является Intact Proviral DNA Assay (IPDA), изначально разработанный для субтипа B [3].

В связи с критической важностью учета генетического разнообразия ВИЧ-1 для точной количественной оценки провирусных резервуаров целью работы стала разработка и валидация метода на основе IPDA для оценки представленности и интактности провирусных резервуаров в мононуклеарах периферической крови (МПК) у наивных лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), инфицированных наиболее распространенными геновариантами ВИЧ-1 на территории РФ: субтипами A6, B и CRF63_02A6.

Материалы и методы

Цифровая ПЦР проводилась на приборе Qiagen QIAcuity dPCR. Праймеры и зонды для провирусных мишеней были сконструированы с учетом циркулирующих геновариантов ВИЧ-1 на территории РФ. Консервативность праймеров и зондов оценивалась с помощью интегрального показателя:

$$\textit{Консервативность} = \textit{Полная гомология (\%)} \times \alpha + \textit{Гомология 3′-конца (\%)} \times \beta,$$

где $\alpha = 0{,}3$ для праймеров и 1,0 для зондов, $\beta = 0{,}7$ для праймеров и 0,0 для зондов.

Для предварительной валидации использовались плазмида, содержащая полный геном ВИЧ-1, а также «дефектные» плазмиды, имитирующие дефекты в выбранных участках-мишенях. Для валидации на биологических образцах использовалась геномная ДНК (гДНК), выделенная из МПК, которые были выделены из цельной крови 104 наивных ЛЖВ из Красноярского и Приморского краев. Первичный анализ данных проводился с использованием QIAcuity Software Suite Ver. 3.0.0.0. Статистические анализы проводились с помощью GraphPad Prism version 10.4.2 for Windows.

© А. И. Мурзин, К. А. Елфимов, А. В. Тотменин, Н. М. Гашникова, Д. П. Зырянова, Л. Г. Готфрид, В. Е. Екушов, М. Р. Халиков, 2025

Результаты и обсуждение

Первым шагом для достижения цели была разработка праймеров и зондов с высокой степенью консервативности среди наиболее распространенных геновариантов ВИЧ-1 на территории РФ (см. таблицу).

Интегральный показатель консервативности наборов праймеров и зондов для целевых участков-мишеней

Наборы	**5´LTR/Gag**			**3´Pol**			**Env**		
Геновариант	F	P	R	F	P	R	F	P	R
A6 (*n* = 197)	95,7	93,4	99,7	99,4	86,3	95,1	92,2	86,3	97,7
B (*n* = 52)	95,4	82,6	100,0	97,2	63,0	96,7	65,4	60,9	96,1
CRF63_02A6 (*n* = 30)	100,0	93,3	100,0	100,0	96,7	99,0	92,7	83,3	99,0
Всего (*n* = 279)	96,1	91,6	99,8	99,1	83,5	95,8	87,7	81,7	97,6

Затем был проведен ряд тестовых анализов на плазмидах, чтобы оценить формирование кластеров для дефектных и интактных провирусов. Полученные нами результаты совпали с ожидаемым формированием кластеров. Поэтому следующим этапом стал расчет Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD) и DNA Shearing Index (DSI) нашего метода. Для расчета LoB были проанализировали 40 образцов гДНК от ВИЧ-отрицательных доноров. При анализе были зарегистрированы только единичные сигналы флуоресценции из кластеров, характерных для дефектных провирусов, что привело к $LoB_{деф.}$ = 6,72 и $LoB_{инт.}$ = 0. Для расчета LoD были проанализировали 8 последовательных 2-кратных разведений полногеномной плазмиды от 128 до 1 копии в 20 повторах для каждого разведения. LoD был определен на уровне 8 копий (SD = 2,964), что в совокупности с рассчитанными LoB привело к $LoD_{деф.}$ = 11,6 и $LoD_{инт.}$ = 4,876. Рассчитанный медианный DSI составил 0,37 (МКР: 0,35–0,40).

При анализе биологических образцов от наивных ЛЖВ медианные значения количества дефектных и интактных провирусных резервуаров составили 2532 копии/10^6 МПК (МКР: 917–7207) и 153,3 копии/10^6 МПК (МКР: 0–841,2) соответственно. Потеря сигнала наблюдалась в 12 из 104 случаев (11,5 %), причем все случаи были связаны с набором праймеров и зондов на участок *3´Pol*.

Полученные нами результаты продемонстрировали эффективность представленного метода для исследования провирусных резервуаров в МПК у ЛЖВ, инфицированных геновариантами, циркулирующими на территории РФ.

Литература

1. Kreider E. F., Bar K. J. HIV-1 Reservoir Persistence and Decay: Implications for Cure Strategies // Curr. HIV/AIDS Rep. 2022. Vol. 19. P. 194–206.

2. Sanders-Beer B. E., Archin N. M., Brumme Z. L. et al. Current HIV/SIV Reservoir Assays for Preclinical and Clinical Applications: Recommendations from the Experts 2022 NIAID Workshop Summary // AIDS Res. Human Retroviruses. 2023. Vol. 40. P. 7–21.

3. Bruner K. M., Wang Z., Simonetti F. R. et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses // Nat. 2019. Vol. 566. P. 120–125.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-213

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ТАРГЕТНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ *

MODERN TARGETED SEQUENCING METHODS AS A TOOL FOR PATHOGEN DIAGNOSTICS

М. И. Надтока[1], А. Ю. Бухарина[1], Г. В. Роев[1,2], А. В. Пересадина[1], А. В. Выходцева[1], С. Е. Гончаров[1], К. Ф. Хафизов[1], В. Г. Акимкин[1]

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

M. I. Nadtoka[1], A. Y. Bukharina[1], G. V. Roev[1,2], A. V. Peresadina[1], A. V. Vykhodtseva[1], S. E. Goncharov[1], K. F. Khafizov[1], V. G. Akimkin[1]

[1] *Central Research Institute of Epidemiology, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ nadtoka@cmd.su

Аннотация

В условиях постоянно растущего разнообразия вирусов, способных инфицировать человека, отчетливо проявляются ограничения традиционных молекулярных методов диагностики. Методики, объединяющие мультиплексные панели праймеров и технологии NGS, выглядят перспективной альтернативой классическим методам. Мы разработали и апробировали методику mp-tNGS, способную выявить широкий спектр вирусов в рамках единого анализа.

Abstract

With the ever-increasing diversity of viruses capable of infecting humans, the limitations of traditional molecular diagnostic methods are becoming clear. Methods combining multiplex primer panels and NGS technologies appear to be a promising alternative to classical methods. We have developed and validated mp-tNGS technique capable of detecting a wide range of viruses in a single assay.

Разнообразие вирусов, способных заразить человека, неуклонно расширяется, помимо этого с развитием глобальной транспортной системы существенно возросла и мобильность патогенов. В текущих условиях, когда опасный патоген с легкостью может распространить инфекцию по всему миру, одним из ключевых направлений развития систем здравоохранения является разработка диагностических решений, способных выявить максимально возможный спектр инфекционных агентов. Одновременное выявление множества возбудителей становится затруднительной задачей для классических молекулярных методов, ввиду чего они медленно, но верно уступают место более современным технологиям. Этот процесс обуславливается несколькими ограничениями традиционных подходов, к наиболее ярко выраженным их которых можно отнести лимитированный набор мишеней в рамках одного анализа и необходимость в наличии предварительной гипотезы о возможном этиологическом агенте в образце. На фоне этого высокопроизводительное секвенирование (NGS) рассматривается как перспективный инструмент диагностики и мониторинга патогенов, преодолевающий ограничения классических методов. Благодаря получению полной геномной информации патогенов такие технологии в последние годы плотно интегрировались в практику обнаружения возбудителей заболеваний, существенно расширив возможности эпидемиологического надзора.

Одним из направлений NGS-диагностики является таргетное секвенирование (targeted NGS, tNGS), применяемое для выявления уже известных патогенов. tNGS позволяет выборочно обогатить последовательности определенных патогенов за счет использования наборов специфических праймеров или зондов. В последнее время все больше внимания приковывает к себе tNGS подход, основанный на использовании мультиплексных панелей — mp-tNGS (multiplex PCR-based tNGS). Этот подход нацелен не столько на углубленную характеристику отдельного вируса, сколько на максимально широкую идентификацию инфекционных агентов за единый анализ. Мультиплексный формат ПЦР подразумевает объединение множества пар праймеров для разных мишеней в единой реакции. В сочетании с технологиями NGS такой подход помогает преодолеть ограничения, присущие традиционным методам, и одновременно определить большее число патогенов в рамках одного исследования.

* Исследование выполнено за счет гранта Центрального НИИ эпидемиологии (ЕГИСУ НИОКТР № 125012900979-9).

© М. И. Надтока, А. Ю. Бухарина, Г. В. Роев, А. В. Пересадина, А. В. Выходцева, С. Е. Гончаров, К. Ф. Хафизов, В. Г. Акимкин, 2025

На основе этого подхода нами была разработана mp-tNGS-методика для одновременной идентификации 28 вирусных патогенов, преимущественно ассоциированных с респираторными инфекциями. В нашем подходе применяется мультиплексная праймерная панель для амплификации и последующего секвенирования консервативных участков геномов целевых возбудителей. При этом каждый праймер, образующий панель, имеет на 5′-конце адаптерную последовательности Nextera. Такая особенность строения праймеров в совокупности с малой длиной получаемых ампликонов (< 300 п. н.) обеспечивает сравнительно быстрый по меркам секвенирования анализ образцов. Одновременно данные особенности позволяют существенно снизить финансовые и временные затраты на диагностику.

Разработанная методика прошла несколько этапов валидации, которые представляли из себя оценку специфичности праймеров, а также определение пределов чувствительности панели. Вдобавок она прошла апробацию на нескольких независимых клинических выборках, которые суммарно насчитывали > 1000 образцов.

Наиболее примечательным результатом исследования клинического материала являлся обширный спектр патогенов, который может быть выявлен в рамках одного анализа посредством нашей методики. При этом с ее помощью возможно одновременно идентифицировать как РНК-, так и ДНК-вирусы. Таким образом, наши результаты демонстрируют перспективность mp-tNGS методик для диагностики, а также подсвечивают их преимущества по охвату разнообразных патогенов в сравнении с традиционными молекулярными подходами.

Кроме того, нами был разработан специальный биоинформатический модуль для анализа данных секвенирования, получаемых с использованием нашей панели. Ключевой особенностью модуля является гибко настраиваемая функция по устранению контаминации из данных каждого образца, благодаря чему становится возможным достоверно идентифицировать возбудителя заболевания. Вдобавок наша программа автоматически формирует наглядный отчет по патогенам, обнаруженным в каждом образце.

Таким образом, наше исследование закладывает прочную основу для создания новых высокочувствительных диагностических решений и демонстрирует, что mp-tNGS-методики могут быть успешно использованы в лабораторной практике.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-214

ОДНОКРАТНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНОЙ ИНДУЦИРУЕТ ДЛИТЕЛЬНУЮ АНТИРАБИЧЕСКУЮ ЗАЩИТУ У МАКАКОВ-РЕЗУСОВ

DYNAMICS OF THE ANTI-RABIES IMMUNE RESPONSE FOLLOWING A SINGLE IMMUNIZATION WITH A RECOMBINANT ADENOVIRUS CARRYING THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN GENE IN RHESUS MACAQUES

А. Э. Никонова[1], М. А. Лосич[1], О. Н. Зайкова[1], В. И. Авидзба[2], Ф. А. Горухчиева[2]

[1]Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва
[2]НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, Сухум

A. E. Nikonova[1], M. A. Losich[1], O. N. Zaykova[1], V. I. Avidzba[2], F. A. Gorukhchieva[2]

[1]N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow
[2]Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum

✉ alionanikon@yandex.ru

Аннотация

Бешенство — одна из немногих инфекционных болезней, которая с практически 100%-й вероятностью заканчивается смертью больного. В Российской Федерации вирус регистрируется повсеместно. В настоящее время разрабатываются новые подходы к созданию антирабических вакцин. Рекомбинантные аденовирусные вакцины могут стать альтернативой инактивированным антирабическим препаратам, обеспечивая сопоставимую длительность гуморального иммунитета при меньшем количестве доз.

Abstract

Rabies is one of the few infectious diseases that is almost 100 % fatal. In the Russian Federation, the virus is found everywhere. New approaches to developing anti-rabies vaccines are currently being explored. Recombinant adenovirus vaccines could become an alternative to inactivated anti-rabies drugs, providing comparable duration of humoral immunity with fewer doses.

Бешенство (*Rabies*) — это острое инфекционное заболевание вирусной этиологии, общее для человека и животных, характеризующееся абсолютной летальностью при развитии клинической симптоматики. Единственным возможным методом предотвращения заболевания после проникновения вируса является своевременная антирабическая иммунопрофилактика.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно от бешенства погибает около 59 000 человек, преимущественно в регионах с ограниченным доступом к медицинской помощи [1]. В Российской Федерации вирус регистрируется практически во всех регионах, но чаще всего в Центральном, Приволжском и Южном федеральных округах. По данным Роспотребнадзора, ежегодно за антирабической помощью обращается около 400 тыс. человек, из них около 250 тыс. человек нуждаются в проведении специфического лечения [2].

Современные вакцины для людей, хотя и высокоэффективны, требуют многократного введения для выработки защитного иммунитета. В настоящее время разрабатываются вакцины на основе новых технологических платформ, в том числе векторных. Одним из наиболее широко используемых вирусных векторов, применяемых для создания рекомбинантных вакцин, является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа (рАд5), который обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого трансгена в клетках-мишенях, индуцирует высокие уровни как гуморального, так и клеточного иммунного ответа и показал свою безопасность во множестве клинических испытаний [3].

Ранее нами был сконструирован аденовирусный вектор экспрессирующий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма RV97, показана иммуногенность и протективность на мышах [4].

Одной из наиболее релевантных моделей для доклинических исследований вакцин являются приматы, в частности макаки-резусы (Macaca mulatta), благодаря их близости к человеку в иммунологическом и физиологическом аспектах.

Цель исследования — изучить длительность иммунного ответа после однократного внутримышечного введения рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего гликопротеин вируса бешенства штамма RV97, на модели нечеловекообразных приматов.

© А. Э. Никонова, М. А. Лосич, О. Н. Зайкова, В. И. Авидзба, Ф. А. Горухчиева, 2025

Материалы и методы

В работе были использованы самцы обезьян вида Макак яванский в возрасте 10–15 лет, массой тела от 4,3 до 14,7 кг. Для оценки иммуногенности полученные сыворотки крови обезьян анализировали с помощью реакции вируснейтрализации (FAVN). Статистический анализ экспериментальных данных проводился с помощью программы Microsoft office Excel 2016 с надстройкой «Пакет анализа».

Результаты и обсуждение

Длительность иммунного ответа изучали на группе макаков, иммунизированных в дозе 4×10^7 БОЕ/животное. Кровь у животных отбирали на 0, 7, 14, 28, 42-й день и 3, 6 и 12-й месяц после иммунизации.

Гуморальный иммунный ответ на гликопротеин вируса бешенства оценивался в реакции непрямого ИФА. Фоновый уровень антител в сыворотке крови животных на 0-й день составил 200 ± 0,0. У всех вакцинированных животных титр антител к гликопротеину вируса бешенства постепенно увеличивался, достиг пика на 42-й день после иммунизации, среднее геометрическое составило 11143,05 ± 10144, до 6 месяцев постепенно снижалось и составило 4222,42 ± 1752,71, с 6-го месяца по 12-й достоверно не отличалось (p = 0,8) (рис. 1).

Для оценки длительности сохранения протективного уровня вируснейтрализующих антирабических антител в ответ на однократную иммунизацию Ad5-RV97 проведена реакция вирус-нейтрализации с флуоресцентными антителами (FAVN). У всех вакцинированных животных титр антирабических ВНА достиг пика на 42-й день и составил в среднем 20,4 ± 7,87 МЕ/мл и стабильно превышал защитный уровень, рекомендованный ВОЗ, 0,5 МЕ/мл на протяжении как минимум 12 месяцев (рис. 2). Через год после иммунизации титр ВНА в среднем в группе составлял 3,48 ± 0,78 МЕ/мл, при этом у всех животных превышал 2 МЕ/мл.

Исходя из полученных и ранее опубликованных результатов, можно сделать вывод, что даже однократное введение рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, несущего ген гликопротеина вируса бешенства штамма RV97, обеспечивает защитный титр антирабических ВНА на протяжении года.

Рекомбинантные аденовирусные вакцины демонстрируют перспективу в качестве альтернативы инактивированным антирабическим препаратам, обеспечивая сопоставимую длительность гуморального иммунитета при меньшем количестве доз (по стандартной схеме 3–4 дозы инактивированной вакцины по протоколу ВОЗ) [5].

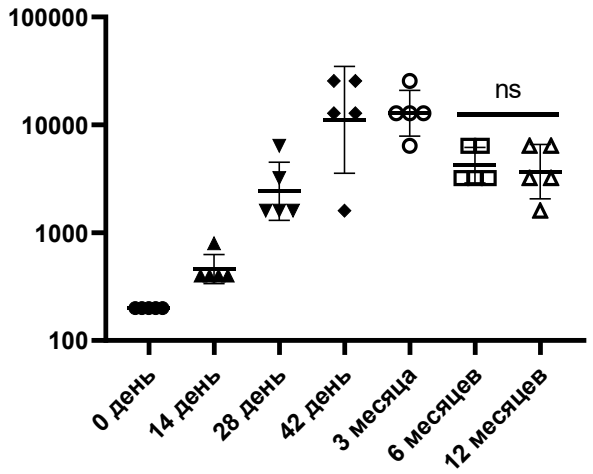


Рис. 1. Динамика изменения титров антител к рекомбинантному гликопротеину G в сыворотке крови животных, иммунизированных Ad5-RV97: *по оси абсцисс* — время после иммунизации; *по оси ординат* — реципрокные титры гликопротеин-специфических IgG. Показано среднее геометрическое титра и геометрическое стандартное отклонение. Все группы достоверно отличались от 0-го дня (p < 0,05)

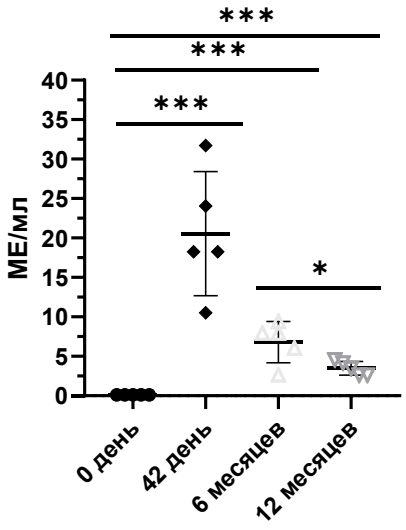


Рис. 2. Длительность сохранения антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных, иммунизированных Ad5-RV97: *по оси абсцисс* — время после иммунизации; *по оси ординат* — уровень антител, выраженный в МЕ/мл. Показано среднее и стандартное отклонение. * — p < 0,05; *** — p < 0,0001

Литература

1. WHO Expert Consultation on Rabies. URL: https://www.who.int.

2. Рекомендации гражданам: профилактика бешенства // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/recommendations/details.php?ELEMENT_ID=20827.

3. Logunov D. Y., Dolzhikova I. V., Zubkova O. V. et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia // Lancet. 2020. Vol. 396 (10255). P. 887–897.

4. Шмаров М. М., Седова Е. С., Никонова А. Э. и др. Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97 // Иммунология. 2020. Т. 41 (4). С. 312–325.

5. Jenkin D., Ritchie A. J., Aboagye J. et al. Safety and immunogenicity of a simian-adenovirus-vectored rabies vaccine: an open-label, non-randomised, dose-escalation, first-in-human, single-centre, phase 1 clinical trial // Lancet Microbe. 2022. Vol. 3 (9). P. e663–e671.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-215

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСПЫ ОБЕЗЬЯН У ПАЦИЕНТОВ С ХАРАКТЕРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНОЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БУРУНДИ В 2024 ГОДУ *

DIFFERENTIAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF MONKEYPOX IN PATIENTS WITH CHARACTERISTIC CLINICAL PICTURE IN THE REPUBLIC OF BURUNDI IN 2024

А. С. Оськина[1], Ал. А. Сергеев[1], М. Ю. Карташов[1], А. А. Сергеев[1], Н. Ю. Пшеничная[2], Г. В. Гопаца[3], Е. М. Родникова[3], А. И. Щербаков[2], И. В. Кутырев[2], N. Nzoyikorera[4], J. Nyandwi[4]

[1]Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
[2]Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва
[3]Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы
[4]Национальный институт общественного здравоохранения, Бужумбура

A. S. Oskina[1], Al. A. Sergeev[1], M. Yu. Kartashov[1], A. A. Sergeev[1], N. Yu. Pshenichnaya[2], G. V. Gopatsa[3], E. M. Rodnikova[3], A. I. Shcherbakov[2], I. V. Kutyrev[2], N. Nzoyikorera[4], J. Nyandwi[4]

[1]State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
[2]Central Research Institute of Epidemiology, Moscow
[3]Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow City Department of Health
[4]National Institute of Public Health, Bujumbura

✉ oskina_as@vector.nsc.ru

Аннотация

По состоянию на 13 октября 2024 г. наибольшее количество случаев заболевания вирусом оспы обезьян (MPXV) было зарегистрировано в Республике Бурунди. В 11 положительных на оспу обезьян (mpox) образцах обнаружены ДНК MPXV, Herpes Simplex 1-го и 2-го типа (HSV-1,2) и Varicella Zoster (VZV). В 30 образцах от пациентов с клинической картиной mpox, но отрицательных на MPXV, были обнаружены генетические маркеры вирусов VZV, HSV-1,2 и Herpesvirus 6-го типа (HHV-6).

Abstract

As of 13 October 2024, the Republic of Burundi has reported the highest number of cases of monkeypox virus (MPXV). Monkeypox, Herpes Simplex types 1 and 2 (HSV-1,2) and Varicella Zoster (VZV) DNA were detected in 11 monkeypox (mpox)-positive samples. VZV, HSV-1,2 and Herpesvirus type 6 (HHV-6) were detected in 30 samples from patients with clinical mpox but negative for MPXV genetic material.

Введение

С января 2023 г. по настоящее время широкое географическое распространение клады I MPXV в Демократической Республике Конго (ДРК) привело к крупнейшей на сегодняшний день вспышке оспы обезьян среди всех эндемичных стран. Эта вспышка привела к распространению MPXV во всех провинциях ДРК, а также к появлению новой клады вируса, клады Ib, особенностью которой является устойчивая передача вируса от человека к человеку [1]. Впервые выявленная в провинции Южное Киву, ДКР, клада Ib быстро распространилась по региону, а также в соседние страны Восточной Африки. По состоянию на 13 октября 2024 г. наибольшее количество случаев заболевания было зарегистрировано в Бурунди — 987 подтвержденных случаев [2].

Цель работы — проведение дифференциальной лабораторной диагностики mpox у пациентов с характерной клинической картиной на территории Республики Бурунди в 2024 г.

Материалы и методы

Исследование проводили с 4 по 7 сентября 2024 г. на базе Российско-Бурундийского НИЦ эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней в Республики Бурунди. Для исследования были получены 10 образцов (соскобы высыпаний, пунктаты везикул и мазок ротоглотки) от пациентов с подтвержденным диагнозом mpox из госпиталя «Медицинский и исследовательский центр Бурунди» (BMRC, г. Бужумбура), 1 образец, который был использован в качестве положительного контроля, был получен из Национального института общественного здра-

* Исследование выполнено в рамках реализации Федерального проекта «Санитарный щит — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

© А. С. Оськина, Ал. А. Сергеев, М. Ю. Карташов, А. А. Сергеев, Н. Ю. Пшеничная, Г. В. Гопаца, Е. М. Родникова, А. И. Щербаков, И. В. Кутырев, J. Nyandwi, N. Nzoyikorera, 2025

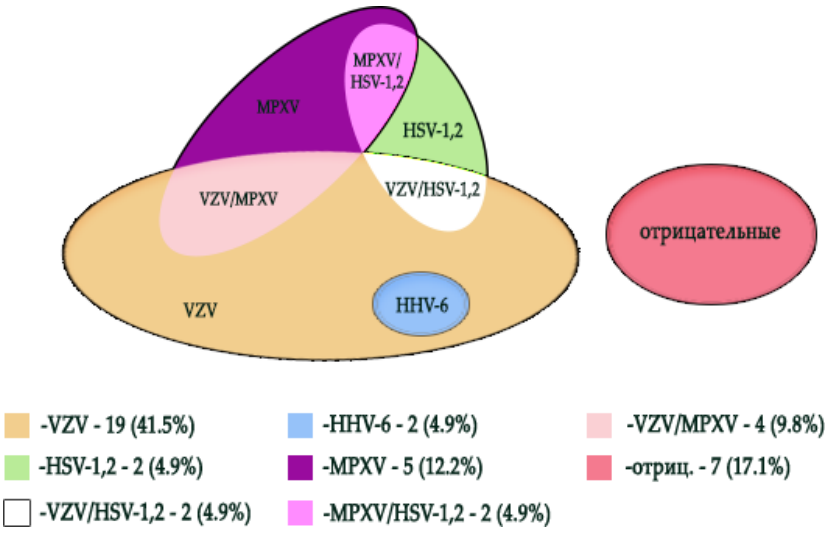
воохранения (INSP, г. Бужумбура) от пациента с подтвержденным диагнозом mpox, а также 30 образцов из банка INSP от пациентов с клинической картиной mpox, но отрицательных на наличие генетического материала MPXV.

В работе было использовано 5 наименований зарегистрированных наборов реагентов отечественного производства: набор реагентов для выявления ДНК вируса оспы обезьян методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРрв-ВОО», набор реагентов для амплификации ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, осповакцины с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Вектор-МПЦРрв-Оспа» производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

АмплиСенс® HSV I, II-FL. Выявление ДНК вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, АмплиСенс® VZV-FL. Выявление ДНК вируса Варицелла — Зостер и АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL. Выявление и количественное определение ДНК вируса герпеса 6-го типа производства ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора. Исследование проводилось с разрешения Национального этического комитета (протокол от 07.08.2024).

Результаты и обсуждение

Был проведен анализ образцов, полученных от пациентов с клинической картиной mpox, на наличие генетического материала некоторых ортопоксвирусов и герпесвирусов (см. рисунок). В 11 положительных на mpox образцах была выявлена ДНК MPXV, также обнаружено высокое содержание генетического материала этого вируса (Ct менее 30). Образцы были проанализированы на наличие ДНК других ортопоксвирусов: вируса натуральной оспы, вируса оспы коров, вируса осповакцины. Генетический материал перечисленных вирусов обнаружен не был. С целью дифференциальной лабораторной диагностики пробы были проанализированы на наличие генетического материала герпесвирусов: HSV-1,2, VZV, HHV-6. Показано, что у 2 пациентов была обнаружена ДНК вируса HSV-1,2, у 4 — ДНК вируса VZV, а ДНК HHV-6 не была обнаружена ни у одного пациента. Кроме того, также с целью проведения дифференциальной лабораторной диагностики было проанализировано 30 проб из банка INSP от пациентов с клинической картиной mpox, но отрицательных на наличие генетического материала MPXV. В 21 пробе была обнаружена ДНК вируса VZV, в 4 пробах — ДНК вирусов HSV-1,2 и в 2 пробах — ДНК HHV-6. В 2 пробах одновременно была детектирована ДНК вируса VZV и HHV-6 и в 2 пробах — ДНК вирусов HSV-1,2 и HHV-6. Эти образцы были также проанализированы на наличие ДНК перечисленных выше ортопоксвирусов. Их генетический материал не был обнаружен.



Результаты дифференциальной лабораторной диагностики

Заключение

С учетом полученных сведений о распространении возбудителей MPXV, VZV, HSV-1,2 и HHV-6 актуальной задачей остается продолжение изучения особенностей циркуляции этих вирусов на территории Республики Бурунди. Важной проблемой, требующей незамедлительного решения, является сложность дифференциальной диагностики заболеваний, имеющих схожую клиническую картину. Регулярный мониторинг и оценка факторов риска возникновения заболеваний позволят разработать алгоритм лабораторной диагностики и рекомендации для врачей Республики Бурунди и других эндемичных стран.

Литература

1. Vakaniaki E. H., Kacita C., Kinganda-Lusamaki E. et al. Sustained human outbreak of a new MPXV clade I lineage in eastern Democratic Republic of the Congo // Nat. Med. 2024. Vol. 30 (10). P. 2791–2795.

2. Nizigiyimana A., Ndikumwenayo F., Houben S. et al. Epidemiological analysis of confirmed mpox cases Burundi, 3 July to 9 September 2024 // Euro Surveill. 2024. Vol. 29 (42). P. 2400647.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-216

БАКТЕРИОФАГ *ACINETOBACTER BAUMANNII* ACIB_323: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ГЕНОМА, ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОЦЕНКА ЕГО ДЕПОЛИМЕРАЗЫ*

BACTERIOPHAGE *ACINETOBACTER BAUMANNII* ACIB_323: GENOME CHARACTERIZATION, LYTIC PROPERTIES, CLONING AND EVALUATION IT'S DEPOLYMERASE[1]

А. Л. Пономарёв[1,2], Ю. Н. Козлова[1], И. К. Байков[1], А. В. Бардашева[1], И. В. Бабкин[1], Н. В. Тикунова[1]

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

A. L. Ponomarev[1,2], Y. N. Kozlova[1], I. K. Baykov[1], A. V. Bardasheva[1], I. V. Babkin[1], N. V. Tikunova[1]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Novosibirsk State University*

✉ sasha.ponomaryovv@mail.ru

Аннотация

Выделен и охарактеризован фаг AciB_323, описаны его антибактериальные свойства, проведен анализ генома. Фаг AciB_323 обладает узким спектром хозяев, высокой литической активностью, не имеет генов лизогении, относится к роду *Obolenskvirus* и имеет миовирусный морфотип. Создан штамм-продуцент деполимеразы фага AciB_323 и исследована активность этого фермента.

Abstract

Phage AciB_323 was isolated and characterized, its antibacterial properties were described, and its genome was analyzed. Phage AciB_323 has a narrow host range, strong lytic characteristics, no lysogeny genes, belongs to the *Obolenskvirus* genus, and has a myovirus morphotype. A strain producing depolymerase of phage AciB_323 was created and the activity of this enzyme was studied.

Acinetobacter baumannii является нозокомиальным агентом, широкое распространение которого в совокупности с быстро распространяющейся антибиотикорезистентностью (в ряде регионов до 80 % штаммов обладают MDR фенотипом) делают *A. baumannii* одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человека. В связи с этим применение бактериофагов и их литических ферментов является перспективным вариантом борьбы с этим видом бактерий. В фаговой терапии в основном используются литические фаги и их литические ферменты для уничтожения соответствующих бактерий-хозяев, при этом клетки человека остаются нетронутыми, и снижается воздействие на симбионтные бактерии, что часто является результатом применения антибиотиков.

Целью работы являлось исследование антибактериальных свойств, изучение генома, проведение сравнительного анализа генома, а также получение и исследование свойств деполимеразы фага AciB_323, специфичного к *A. baumannii*.

Фаг AciB_323 выделен из сточных вод и способен заражать 5 штаммов *A. baumannii* из 45 протестированных. Фаг образует на чувствительных культурах прозрачные бляшки, окруженные гало, что указывает на наличие у фага белка с деполимеразной активностью. Фаг AciB_323 сорбируется на поверхности клеточной стенки хозяйского штамма с коэффициентом сорбции ~ $2{,}4 \times 10^{-9}$, что свидетельствует о наличии сотен бактериальных рецепторов, с которыми способен связываться фаг. Латентный период фага занимает 10 мин, один цикл размножения — 25 мин; размер фагового потомства составляет в среднем ~ 260 вирусных частиц. Фаг AciB_323 проявил высокую литическую активность, снижая концентрацию бактериальных клеток на 5 порядков за один час. Электронные микрофотографии фага показали наличие у него длинного сократимого хвоста, что позволяет отнести его к фагам с миовирусным морфотипом; форма головки фага округлая, имеет размер ~ 63 нм в диаметре, длина хвоста составляет ~ 94 нм.

Длина генома фага AciB_323 составила 46 462 п. н., в геноме обнаружено 90 открытых рамок считывания, и для 58 из них удалось выяснить функцию. Геном фага AciB_323 содержит два кластера генов: кластер генов,

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300671-8).

© А. Л. Пономарёв, Ю. Н. Козлова, И. К. Байков, А. В. Бардашева, И. В. Бабкин, Н. В. Тикунова, 2025

кодирующих структурные белки и белки сборки капсида, и кластер генов, кодирующих белки репликации. В геноме обнаружены гены, кодирующие эндолизин и холин, а также белок иммунитета к суперинфекции. У фага обнаружены гены, кодирующие хвостовой белок-рулетку (*tail tape measure protein*) и белок хвостового чехла (*tail sheath protein*), что подтверждает его миовирусный морфотип. По результатам сравнительного анализа генома было выяснено, что фаг AciB_323 принадлежит к роду *Obolenskvirus*.

Биоинформатический анализ показал, что белок хвостовых шипов (*tail spike protein* — TSP) обладает деполимеразной активностью. Ген *tsp* был клонирован; белок TSP был наработан, выделен и очищен. Выход белка составил 27 мг/л культуры. Продемонстрирована способность деполимеразы AciB_323 разрушать капсулу *A. baumannii*. Минимальная концентрация, при которой белок проявлял активность, составила 0,86 мкг/мл. Была оценена способность фага AciB_323 и его деполимеразы подавлять рост планктонной культуры и биопленок *A. baumannii*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-217

ВЛИЯНИЕ АДАПТИВНЫХ МУТАЦИЙ НА АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА НУКЛЕОКАПСИДА SARS-COV-2

THE IMPACT OF ADAPTIVE MUTATIONS ON THE ANTIGENIC PROPERTIES OF THE SARS-COV-2 NUCLEOCAPSID PROTEIN

А. Я. Рак, П. И. Прокопенко, В. В. Музурова, И. Н. Исакова-Сивак

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

A. Ya. Rak, P. I. Prokopenko, V. V. Muzurova, I. N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ alexandrak.bio@gmail.com

Аннотация

Различный характер гуморальных иммунных ответов, индуцируемых иммунизацией рекомбинантными белками нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2 вариантов B.1, B.1.1.529 и содержащих адаптивные мутации P13L, R203K и G204R, свидетельствует о роли этих аминокислотных замен в моделировании антигенных свойств N-компонента в процессе вирусной эволюции.

Abstract

The different pattern of humoral immune responses induced by immunization with recombinant nucleocapsid (N) proteins of SARS-CoV-2 variants B.1, B.1.1.529 and bearing adaptive mutations P13L, R203K and G204R indicates the role of these amino acid substitutions in modeling the antigenic properties of the N component during viral evolution.

На сегодняшний день в мире зарегистрировано более чем 704 млн случаев заражения SARS-CoV-2, и с появлением все новых штаммов коронавируса это число продолжает расти. Эффективная борьба с распространением инфекции COVID-19 невозможна без понимания молекулярных механизмов ее прогрессии, а также в отсутствие высокоспецифичных этиотропных средств терапии и вакцинопрофилактики.

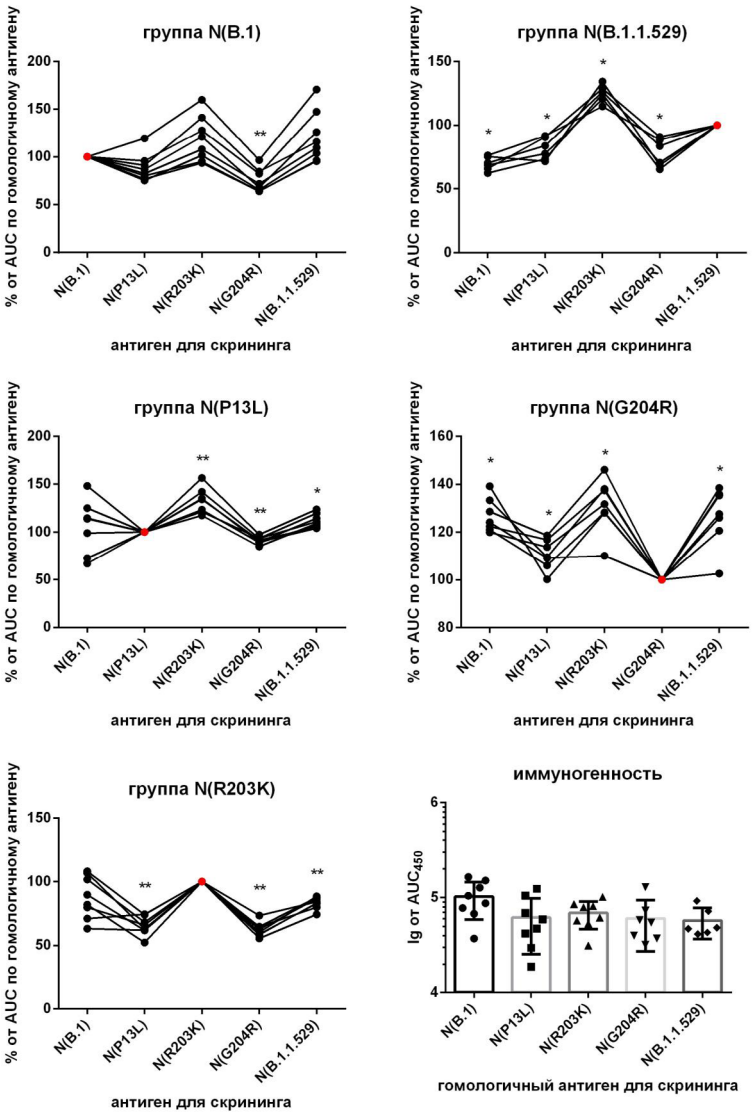
Ввиду значительной изменчивости поверхностных антигенов коронавируса в последние годы усилия исследователей направлены на создание универсальной вакцины против COVID-19 на основе наиболее консервативного компонента SARS-CoV-2. Одним из них является белок нуклеокапсида, или нуклеопротеин (N), — основной антиген вирионов, активно синтезируемый зараженными клетками и вызывающий интенсивную выработку противовирусных антител при COVID-19. Этот антиген также служит одной из главных мишеней противовирусного Т-клеточного иммунного ответа, что делает целесообразной разработку на его основе универсальных рекомбинантных вакцин против COVID-19. Несмотря на то что антитела против N-белка не обладают нейтрализующей активностью, они могут обеспечивать противовирусную защиту, выполняя функцию активаторов реакций врожденного иммунитета — каскада комплемента или антитело-опосредованного клеточного фагоцитоза/цитотоксичности.

Несмотря на достаточно высокую степень консервативности, N-белок также подвержен медленным эволюционным изменениям. Их адаптивность, т. е. появление в антигенном репертуаре вируса под давлением иммунного ответа хозяина, может повлиять на антигенные свойства N-компонента, но до сих пор остается неизученной. Подобные исследования представляются весьма актуальными как с точки зрения разработки кросс-протективных вакцин, так и для оценки релевантности существующих диагностических тест-систем, подразумевающих использование рекомбинантного N-белка предкового штамма коронавируса в качестве антигена.

В течение первых двух лет пандемии (2019–2020 гг.) комбинация R203K/G204R была основной выявляемой аминокислотной заменой (37 %) в N-белке SARS-CoV-2. В свою очередь, представляет интерес и аминокислотная замена P13L/S, расположенная в иммунодоминантной области-мишени для Т-клеток с фенотипом центральной и эффекторной памяти. Упомянутые мутации уникальны для SARS-CoV-2 линий B.1.351, P.1, B.1.617.2 и B.1.1.529, и их можно рассматривать в качестве escape-вариаций, появившихся в вирусном геноме в результате уклонения от иммунного ответа хозяина и потенциально способных повлиять на антигенность N-белка.

Цель работы — исследовать кросс-специфичность анти-N-антител, выработанных к рекомбинантным нуклеопротеинам эволюционно отдаленных вариантов B.1 (Wuhan), B.1.1.529 (Omicron), а также к содержащим

© А. Я. Рак, П. И. Прокопенко, В. В. Музурова, И. Н. Исакова-Сивак, 2025



Относительная специфичность анти-N-антител по отношению к гомологичным и гетерологичным антигенам и иммуногенность пяти вариантов рекомбинантных N-белков.
AUC — площадь под кривой OD_{450}, ** — $p < 0{,}01$, * — $p < 0{,}05$

«промежуточные» аминокислотные замены в положениях P13L, R203K, G204R.

Для проведения исследования полноразмерные рекомбинантные гистаг-содержащие N-антигены коронавируса были экспрессированы в клетках E.Coli BL21(DE3), очищены методом металл-аффинной хроматографии, а также масс-спектрометрически и иммунохимически идентифицированы. Далее их использовали для трехкратной иммунизации мышей линии BALB/c (внутрибрюшинно, 15 мкг/животное с двухнедельным интервалом) в комплексе с адъювантом (гидроксидом алюминия, 1 : 3), а также в качестве подложки в иммуноферментном анализе в концентрации 2 мкг/мл для скрининга полученных гипериммунных мышиных анти-N сывороток.

Несмотря на выраженную кросс-реактивность выработанных у мышей анти-N-антител и сходную иммуногенность белков, сродство N-специфических антител в отношении гетерологичных антигенов существенно различалось (см. рисунок). В частности, иммунизация животных различными мутантными N приводила к формированию антител, преимущественно распознающих белок с мутацией R203K и наименее активно — с заменой G204R. Эти факты хорошо согласуются с тандемным характером появления данных замен в процессе вирусной эволюции и представлениями о моделирующей антигенные свойства роли медленно появляющихся в иммуногенных эпитопах N аминокислотных замен (адаптивных мутаций).

Полученные результаты свидетельствуют о неодинаковой специфичности гуморальных иммунных ответов, индуцируемых N-антигеном различных вариантов коронавируса, несмотря на его общий консерватизм, что необходимо учитывать при разработке новых тест-систем и прототипов универсальных вакцин.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-218

ДНКЗИМ-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОКОМПОЗИТЫ, АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА A/H5N1 *

DNAZYME-CONTAINING NANOCOMPOSITES ACTIVE AGAINST INFLUENZA A VIRUS H5N1

М. Е. Ребус[1], Е. И. Филиппова[1], М. А. Проценко[1], Е. В. Макаревич[1], М. Н. Репкова[2], В. Ф. Зарытова[2], А. С. Левина[2], Л. Н. Шишкина[1]

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

M. E. Rebus[1], E. I. Filippova[1], M. A. Protsenko[1], E. V. Makarevich[1], M. N. Repkova[2], V. F. Zarytova[2], A. S. Levina[2], L. N. Shishkina[1]

[1] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ rebus_me@vector.nsc.ru

Аннотация

ДНКзимы (Dz) представляют большой интерес в качестве терапевтических нуклеиновых кислот, поскольку могут каталитически расщеплять РНК, являясь, таким образом, геноспецифичными ножницами. На основе наночастиц аминосиланола (Si) и анатаза (Ans) созданы ДНКзим-содержащие нанокомпозиты. Полученные нанокомпозиты Si~Dz и Ans~Dz проявили высокую активность в клеточной системе в отношении вируса гриппа A/H5N1: они подавляли репликацию вируса на 3,5 lg.

Abstract

DNAzymes (Dz) are of great interest as therapeutic nucleic acids since they can catalytically cleave RNA, thus being gene-specific scissors. DNAzyme-containing nanocomposites based on nanoparticles of aminosilanol (Si) and anatase (Ans) have been created. The obtained Si~Dz and Ans~Dz nanocomposites showed high activity in the cellular system against the influenza A/H5N1 virus: they suppressed virus replication by 3.5 $\log_{10}$.

Фрагменты нуклеиновых кислот (НК) привлекают большое внимание как перспективные терапевтические агенты. Наиболее интересные среди них — siRNA и ДНКзимы (Dz), которые могут каталитически расщеплять РНК, являясь, таким образом, геноспецифичными молекулярными ножницами [1]. ДНКзимы обладают рядом преимуществ по сравнению с siRNA: бóльшая устойчивость к нуклеазам и меньшая стоимость [2]. Показано, что наночастицы аминопропилсиланола (Si ~ NH_2) и диоксида титана в форме анатаза (Ans) эффективно доставляют фрагменты НК в эукариотические клетки [3, 4].

Цель работы — исследование возможности нанокомпозитов на основе наночастиц Ans и Si~NH_2, несущих Dz, подавлять репликацию вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

В работе использован Dz (5′-GAAATAAGAGGCTAGCTACAACGACCTTCATTA), направленный на (+) РНК сегмента 5-го вируса гриппа А, так как он проявил наибольшую антивирусную активность среди большого набора ДНКзимов [5]. Некомплементарный Dz(n/c) (TCAACTCCAGGCTAGCTACAACGAATGCCATGT) использован для контроля. Структура Dz состоит из трех частей: каталитически активного 15-мерного центрального фрагмента (в рамке), окруженного двумя короткими фрагментами для нацеливания на определенные участки РНК.

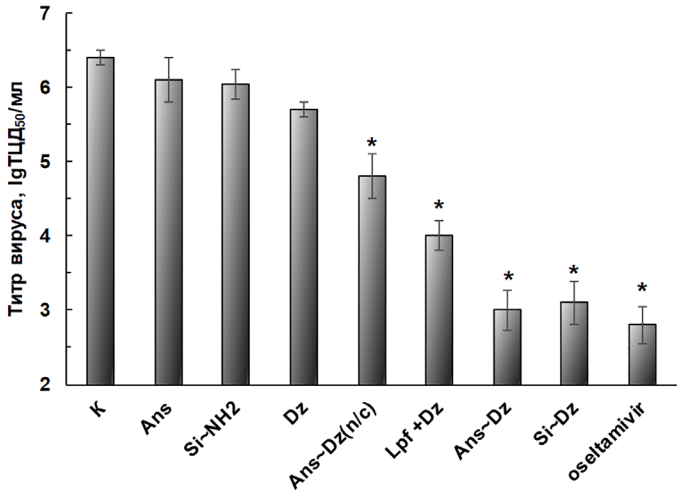
Нанокомпозиты Si~NH_2~Dz (далее Si~Dz) и Ans~PL~Dz (далее Ans~Dz) получали иммобилизацией Dz соответственно на наночастицах Si~NH_2 [4] и Ans, предварительно покрытых полилизином [6].

Показано, что Dz в этих нанокомпозитах сохраняет способность расщеплять РНК-мишень в бесклеточной системе так же, как и несвязанные молекулы Dz. Нанокомпозиты Ans~Dz и Si~Dz проникают в эукариотические клетки, причем Dz обнаруживается в цитоплазме и ядрах [3, 4].

Противовирусную активность Ans~Dz и Si~Dz в клетках MDCK, зараженных вирусом гриппа A/H5N1, изучали при концентрации 5 мкг/мл (0,1 мкМ по Dz), что намного ниже их 50 % токсических концентраций (TC_{50} = 1500 мкг/мл) [7]. Эксперименты проводили как описано в [4, 6]. Результаты приведены на рисунке.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 30/21) и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300656-5).

© М. Е. Ребус, Е. И. Филиппова, М. А. Проценко, Е. В. Макаревич, М. Н. Репкова, В. Ф. Зарытова, А. С. Левина, Л. Н. Шишкина, 2025



Противовирусная активность исследуемых образцов в отношении A/H5N1. Концентрации образцов: Dz — 0,1 мкМ; Ans — 5 мкг/мл; $Si{\sim}NH_2$ — 0,1 мМ; озельтамивир — 150 мкг/мл. K — титр вируса в клетках без добавления образца. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. * — отличие от контроля (без образца) по методу Спирмена — Кербера, $p \leqslant 0{,}05$

Наночастицы и не связанный с ними Dz практически не обладают противовирусной активностью. Нанокомпозиты Ans~Dz и Si~Dz подавляли репликацию вируса на 3,4 и 3,3 lg соответственно, что превышает эффективность Dz в присутствии трансфекционного агента липофектамина (Lpf + Dz). Препарат сравнения озельтамивир был несколько активнее предложенных нанокомпозитов. Нанокомпозит Ans~Dz(n/c), несущий некомплементарный Dz, хотя и проявил заметную активность (подавление на 1,5 lg), но она была намного ниже активности нанокомпозитов Ans~Dz и Si~Dz, что указывает на селективность действия целевого Dz.

Таким образом, в работе продемонстрирована высокая противовирусная активность нанокомпозитов на основе наночастиц аминосиланола и анатаза против вируса гриппа A/H5N1 в клеточной системе. Полученные результаты указывают на антисмысловой эффект олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК. В связи с этим антисмысловая технология может быть перспективной для лечения гриппозной инфекции.

Литература

1. Baum D.A., Silverman S.K. Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo // Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65. P. 2156–2174.

2. Franzen S. Expanding the catalytic repertoire of ribozymes and deoxyribozymes beyond RNA substrates // Curr. Opin. Mol. Ther. 2010. Vol. 12. P. 223–232.

3. Levina A.S., Repkova M.N., Shikina N.V. et al. TiO_2~Deoxyribozyme nanocomposites as delivery system and efficient site-specific agents for cleavage of RNA targets // Drug Deliv. Let. 2014. Vol. 4. P. 142–147.

4. Levina A.S., Repkova M.N., Shikina N.V. et al. Non-agglomerated silicon–organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties // Beilstein J. Nanotechnol. 2018. Vol. 9. P. 2516–2525.

5. Evdokimov A.A., Mazurkova N.A., Malygin E.G. et al. Design of deoxyribozymes for inhibition of influenza A virus reproduction // Mol. Biol. (Russian). 2012. Vol. 46. P. 1–11.

6. Левина А.С., Исмагилов З.Р., Репкова М.Н. и др. Создание TiO_2~DNA-нанокомпозитов, способных проникать в клетки // Биоорг. хим. 2013. Т. 39. С. 87–98.

7. Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R. et al. High-performance method for specific effect on nucleic acids in cells using TiO_2~DNA nanocomposites // Sci. Rep. 2012. Vol. 2. P. 756.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-219

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ КОРНЕЙ *ROSA* SPP. В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А *

STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF *ROSA* SPP. ROOT EXTRACTS AGAINST INFLUENZA A VIRUS

М. Е. Ребус[1], Е. И. Филиппова[1], Е. А. Карпова[2], М. А. Проценко[1], Е. П. Храмова[2], Е. В. Макаревич[1], М. В. Козлова[2], О. Ю. Васильева[2], Т. М. Шалдаева[2], Л. Н. Шишкина[1]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2]*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск*

M. E. Rebus[1], E. I. Filippova[1], E. A. Karpova[2], M. A. Protsenko[1], E. P. Khramova[2], E. V. Makarevich[1], M. V. Kozlova[2], O. Y. Vasilieva[2], T. M. Shaldaeva[2], L. N. Shishkina[1]

[1]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2]*Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk*

✉ rebus_me@vector.nsc.ru

Аннотация

Изучены химический состав и противовирусная активность этанольных и водных экстрактов корней *Rosa majalis*, *Rosa canina* и *Rosa glauca* в отношении вируса гриппа А. Выявлено, что этанольный экстракт корня *Rosa majalis* содержит высокие концентрации фенольных соединений и сапонинов. Водный экстракт корня *Rosa glauca* показал высокую противовирусную активность.

Abstract

The chemical composition and antiviral activity of ethanol and water extracts of the roots of *Rosa majalis*, *Rosa canina* and *Rosa glauca* against influenza A virus were studied. It was revealed that the ethanol extract of *Rosa majalis* root contains high concentrations of phenolic compounds and saponins. The aqueous extract of *Rosa glauca* root showed high antiviral activity.

Вирус гриппа характеризуется активной сезонной циркуляцией, затрагивающей большую часть населения Земли [1]. Высокая скорость изменчивости вируса гриппа вследствие быстропротекающих мутаций обусловливает возникновение резистентности штаммов вируса к применяемым противовирусным препаратам, что приводит к снижению их эффективности [2]. По этой причине необходима разработка новых эффективных и безопасных лекарственных средств для терапии вирусных инфекций.

Растительное сырье обладает высоким потенциалом в качестве источников новых препаратов на основе метаболитов с широким спектром биологической активности. Различные виды шиповника *Rosa* широко выращиваются по всему миру в качестве декоративных растений и пищевых продуктов, а их плоды используются в фармацевтической промышленности. Несмотря на то что плоды шиповника хорошо изучены как источники витаминов, информация о соединениях и их биологической активности корней *Rosa* все еще ограничена [3, 4].

Целью исследования была оценка потенциала этанольных и водных экстрактов корней шиповника майского *Rosa majalis* Herrm., шиповника собачьего *Rosa canina* L. и шиповника сизого *Rosa glauca* Pourr. как источников новых противовирусных препаратов.

Для исследования использовались корни *Rosa majalis*, *Rosa canina* и *Rosa glauca*, полученные из Центрального сибирского ботанического сада СО РАН.

Этанольные и водные экстракты были получены из высушенного сырья. Экстракты анализировали на содержание фенольных соединений и сапонинов с помощью спектрофотометрии [5]. Из всех 6 исследуемых образцов этанольный экстракт *Rosa majalis* показал наивысшее содержание всех исследуемых групп биологически активных веществ.

Противовирусную активность экстрактов в отношении штаммов вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) тестировали в культуре клеток MDCK. Определяли 50%-е цитотоксические (CC_{50}) и 50%-е вирус-ингибирующие концентрации (IC_{50}) колориметрическим методом, основанным на определении способности препаратов подавлять цитопатическое действие вируса. Рассчитывали индекс селективности

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 30/21) и государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (№ АААА-А21-121011290025-2).

© М. Е. Ребус, Е. И. Филиппова, Е. А. Карпова, М. А. Проценко, Е. П. Храмова, Е. В. Макаревич, М. В. Козлова, О. Ю. Васильева, Т. М. Шалдаева, Л. Н. Шишкина, 2025

(SI) исследуемых экстрактов как отношение CC_{50} к IC_{50}. В соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств образцы препаратов, индекс селективности которых составляет не менее 8, являются перспективными для проведения дальнейших исследований [6]. Показано, что все этанольные экстракты проявляли противовирусный эффект в отношении штамма A/Aichi/2/68 (H3N2). При этом водные экстракты *Rosa glauca* (SI > 64,1) и *Rosa majalis* (SI > 59,2) обладали большей активностью в отношении этого штамма, чем соответствующие этанольные экстракты. В отношении штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) активность проявили этанольные экстракты *Rosa majalis* (SI > 12,2) и *Rosa canina* (SI > 14,1) и водный экстракт *Rosa glauca* (SI > 13,0).

Результаты исследований позволяют рассматривать водный экстракт корней *Rosa glauca* как приоритетный объект для более расширенных исследований. Этот выбор обоснован эффективностью экстракта в отношении обоих исследуемых штаммов вируса гриппа А.

Литература

1. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview // Eur. J. Clin. Microbiol. Infectious Disease. 2020. Vol. 39, No. 7. P. 1201–1208.

2. Зырянов С. К., Бутранова О. И., Гайдай Д. С. и др. Фармакотерапия острых респираторных инфекций, вызванных вирусами гриппа // Терапевт. архив. 2021. Т. 93, № 1. С. 114–124.

3. Bozanic Tanjga B., Ljubojevic M., Dukic A. et al. Selection of Garden Roses to Improve the Ecosystem Services They Provide // Horticultura. 2022. Vol. 8 (10). P. 883.

4. Olech M., Nowacka-Jechalke N., Pecio L. et al. Evaluation of rose roots, a post-harvest plantation residue as a source of phytochemicals with radical scavenging, cytotoxic, and antimicrobial activity // Ind. Crops Products. 2015. Vol. 69. P. 129–136.

5. Лобанова И. Е., Кукушкина Т. А., Шалдаева Т. М. и др. Фитохимическая характеристика и противовирусная активность экстрактов Astragalus glycyphyllos (Fabaceae) // Растительный мир Азиатской России: вестн. Центр. сиб. бот. сада СО РАН. 2024. Т. 17, № 2. С. 120–130.

6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова. Ч. I. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-220

ОЛИГОНУКЛЕОТИД-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОКОМПОЗИТЫ, АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ *

OLIGONUCLEOTIDE-CONTAINING NANOCOMPOSITES ACTIVE AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUSES OF THE FIRST AND SECOND TYPES

М. Е. Ребус[1], Е. В. Макаревич[1], М. А. Проценко[1], Е. И. Филиппова[1], М. Н. Репкова[2], В. Ф. Зарытова[2], А. С. Левина[2], Л. Н. Шишкина[1]

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

M. E. Rebus[1], E. V. Makarevich[1], M. A. Protsenko[1], E. I. Filippova[1], M. N. Repkova[2], V. F. Zarytova[2], A. S. Levina[2], L. N. Shishkina[1]

[1] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ rebus_me@vector.nsc.ru

Аннотация

Исследована активность нанокомпозитов на основе наночастиц анатаза, несущих антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на различные участки вирусных геномов, в отношении вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ1 и ВПГ2). Наиболее эффективные нанокомпозиты снижали репродукцию ВПГ1 и ВПГ2 *in vitro* на 3,5 и 2,0 lg соответственно.

Abstract

The activity of nanocomposites based on anatase nanoparticles carrying antisense oligonucleotides targeting various regions of the viral genomes has been studied against herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV1 and HSV2). The most effective nanocomposites reduced HSV1 and HSV2 reproduction *in vitro* by 3.5 and 2 $\log_{10}$, respectively.

Борьба с герпес-вирусными инфекциями является актуальной задачей, поскольку вирус простого герпеса (ВПГ) широко распространен среди населения и вызывает большой спектр заболеваний.

Антисенс-технология с использованием фрагментов нуклеиновых кислот, в частности антисмысловых олигонуклеотидов (ON), является перспективной для борьбы с ВПГ. Успех этой стратегии зависит от системы доставки ON в клетки, их стабильности в клетках и выбора подходящей мишени.

Антисмысловые ON изучаются в качестве потенциальных препаратов от различных заболеваний, связанных с «вредными» нуклеиновыми кислотами. ON способны длительно и эффективно подавлять репликацию вируса простого герпеса в клеточной системе [1] и повышать выживаемость лабораторных животных [2].

Целью работы было использование нанокомпозитов на основе наночастиц диоксида титана в форме анатаза (Ans), несущих ON, для подавления репликации ВПГ первого и второго типов (ВПГ1 и ВПГ2).

Ans-наночастицы обеспечивают доставку ON в клетки и защищают их от клеточных нуклеаз [3]. На основании анализа литературных данных [4] выбрано несколько последовательностей ON, успешных для подавления репликации ВПГ1 и ВПГ2. В качестве контрольного ON использовали олигонуклеотид SCR, не комплементарный вирусному геному.

ВПГ1		ВПГ2	
5'-GGCGTCCTCCTTp	ON1	5'-GCCATTGGAACCp	ON5
5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCGp	ON2	5'-AGGGCGTTCCTCCTGp	ON6
5'-ACGAGGGCGTTCCTCCTGCGp	ON3	5'-GCCCGGCCTGCGAGp	ON7
5'-ACGTTCCTCCTGCGGGAAp	ON4	5'-ACGAGCGTGTTACTTCTGCGp	SCR (контроль для ВПГ1 и ВПГ2)

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300656-5).

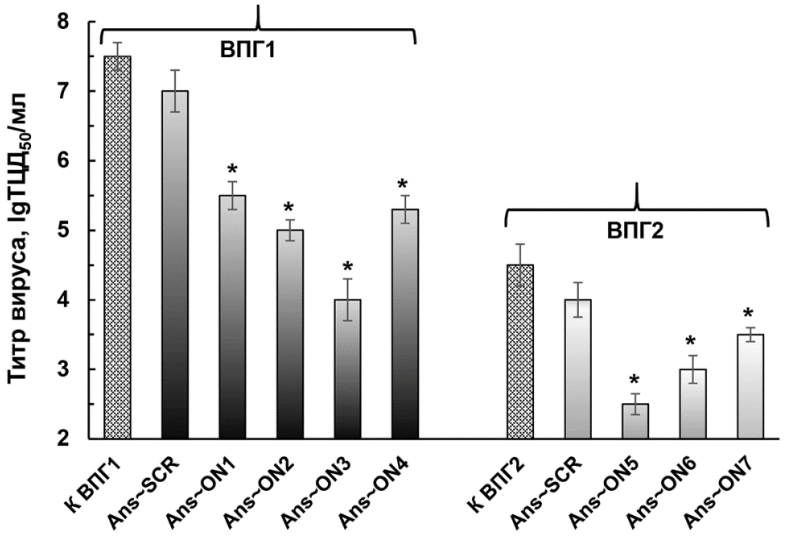
© М. Е. Ребус, Е. В. Макаревич, М. А. Проценко, Е. И. Филиппова, М. Н. Репкова, В. Ф. Зарытова, А. С. Левина, Л. Н. Шишкина, 2025

Полилизин-содержащие конъюгаты PL-ON иммобилизовали на наночастицах Ans и получали нанокомпозиты Ans/PL-ON (далее Ans~ON) [5].

Для Ans~ON оценены значения максимально переносимой концентрации (МТС = 0,75 мг/мл) и 50%-й цитотоксической концентрации (CC_{50} = 1,3 мг/мл) для клеток Vero.

Противовирусную активность Ans~ON в клетках Vero, зараженных ВПГ1 и ВПГ2, изучали при нетоксических концентрациях (0,1 мг/мл, что соответствует концентрации ON в нанокомпозитах 2 мкМ). Эксперименты проводили так же, как описано в [6].

Все исследованные нанокомпозиты подавляли репликацию вирусов на 1,5–3,5 lg (см. рисунок). Наиболее активными были ON3 для ВПГ1 и ON6 для ВПГ2. Примечательно, что Ans~SCR был практически неактивен в обоих случаях.



Противовирусная активность образцов в отношении ВПГ1 и ВПГ2. К — титр вируса в клетках без добавления образца. Концентрация ON в нанокомпозитах = 2 мкМ. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. * — отличие от контроля (без образца) по методу Спирмена — Кербера, $p \leqslant 0{,}05$

Показано, что нанокомпозиты Ans~ON не проявляют вирулицидных свойств в бесклеточных экспериментах в отношении ВПГ даже при высокой концентрации (1 мг/мл), на порядок превышающую рабочую концентрацию. Это означает, что наночастицы не разрушают вирусную оболочку, и только внутри клетки вирусный геном уязвим для антисмысловых ON.

Таким образом, показано, что нанокомпозиты Ans~ON являются эффективными агентами для ингибирования ВПГ1 и ВПГ2. Полученные результаты указывают на антисмысловой эффект олигонуклеотидов, нацеленных на вирусную мРНК. В связи с этим антисмысловая технология может быть перспективной для разработки антигерпетических препаратов.

Литература

1. Shoji Y., Norimatsu M., Shimada J. et al. Limited use of cationic liposomes as tools to enhance the antiherpetic activities of oligonucleotides in Vero cells infected with herpes simplex virus type 1 // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1998. Vol. 8. P. 255–263.

2. Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Eide K. et al. Inhibition of HSV-1 ocular infection with morpholino oligomers targeting ICP0 and ICP27 // Antiviral Res. 2009. Vol. 84. P. 131–141.

3. Levina A.S., Repkova M.N., Shikina N.V. et al. Pronounced therapeutic potential of oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles against highly pathogenic H5N1 influenza A virus in vivo // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2021. Vol. 162. P. 92–98.

4. Левина А.С., Репкова М.Н., Зарытова В.Ф. и др. Терапевтические нуклеиновые кислоты против вирусов простого герпеса // Биоорг. химия 2023. Т. 49 (6). С. 591–610.

5. Levina A., Ismagilov Z., Repkova M. et al. Nanocomposites consisting of titanium dioxide nanoparticles and oligonucleotides // J. Nanosci. Nanotech. 2012. Vol. 12. P. 1812–1820.

6. Репкова М.Н., Зарытова В.Ф., Мазурков О.Ю. и др. Эффективное ингибирование репликации вируса простого герпеса 1-го типа *in vitro* с помощью олигонуклеотид-содержащих нанокомпозитов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2024. Т. 79 (4). С. 338–345.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-221

ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГРИППА A/H5N1 *IN VITRO* НЕМОДИФИЦИРОВАННЫМИ SIRNA В СОСТАВЕ НАНОКОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ АМИНОПРОПИЛСИЛАНОЛА *

SUPPRESSION OF INFLUENZA A/H5N1 VIRUS REPLICATION *IN VITRO* BY UNMODIFIED SIRNAS IN NANOCOMPLEXES BASED ON AMINOPROPYLSILANOL NANOPARTICLES

М. Е. Ребус[1], Е. И. Филиппова[1], М. А. Проценко[1], Е. В. Макаревич[1], Б. П. Челобанов[2], М. Н. Репкова[3], А. С. Левина[3], В. Ф. Зарытова[3], Л. Н. Шишкина[1]

[1]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[3]*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

M. E. Rebus[1], E. I. Filippova[1], M. A. Protsenko[1], E. V. Makarevich[1], B. P. Chelobanov[2], M. N. Repkova[3], A. S. Levina[3], V. F. Zarytova[3], L. N. Shishkina[1]

[1]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[3]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ rebus_me@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе показано, что наночастицы аминопропилсиланола ($SiNH_2$) в составе нанокомплексов $SiNH_2$~siRNA доставляют siRNA в клетки, защищают их от гидролиза клеточными ферментами и обеспечивают молекулам siRNA возможность с высокой эффективностью подавлять репликацию вируса гриппа A/H5N1.

Abstract

The work shows that aminopropylsilanol ($SiNH_2$) nanoparticles in the $SiNH_2$~siRNA nanocomplexes deliver siRNA to cells, protect them from hydrolysis by cellular enzymes, and provide siRNA molecules with the ability to suppress influenza A/H5N1 virus replication with high efficiency.

Малые интерферирующие РНК (siRNA) являются перспективными терапевтическими средствами на основе РНК. Однако их потенциал полностью не реализован. Ограничивающими факторами являются низкая эффективность доставки siRNA в клетки-мишени и деградация siRNA клеточными нуклеазами. Одним из наиболее эффективных подходов к решению проблемы доставки siРНК в клетки является использование невирусных векторов на основе наночастиц (НЧ) [1].

Целью работы является исследование возможности НЧ аминопропилсиланола ($SiNH_2$) в составе нанокомплексов с siRNA ($SiNH_2$~siRNA) способствовать проникновению siRNA в клетки, защите их от гидролиза клеточными ферментами и в итоге подавлению репликации вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

В качестве мишени для воздействия с помощью siRNA выбран сегмент 5-го вируса гриппа А, кодирующий нуклеопротеин [2]. Использованы две siRNA (см. таблицу), направленные на кодирующую область сегмента 5, которая является консервативной и уязвимой к действию siРНК [3]. В качестве контроля использована siRNA-SCR, неспецифическая к вирусу гриппа А.

Нуклеотидные последовательности siRNA

Цепь	Последовательность 5′→3′	siRNA
RNA1	CUCCGAAGAAAUAAGAUCC	siRNA1/2
RNA2	GGAUCUUAUUUCUUCGGAG	
RNA3	CUCCGAAGAAAUAAGAUCC(dTdT)	siRNA3/4
RNA4	GGAUCUUAUUUCUUCGGAG(dTdT)	

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-10105)

© М. Е. Ребус, Е. И. Филиппова, М. А. Проценко, Е. В. Макаревич, Б. П. Челобанов, М. Н. Репкова, А. С. Левина, В. Ф. Зарытова, Л. Н. Шишкина, 2025

Нанокомплексы $SiNH_2$~siRNA (далее Si~siRNA) получали иммобилизацией siRNA на $SiNH_2$ [4]. Показано, что нанокомплекс Si~siRNA проникает в клетки MDCK, причем обе цепи проникают в составе сформированного дуплекса (рис. 1).

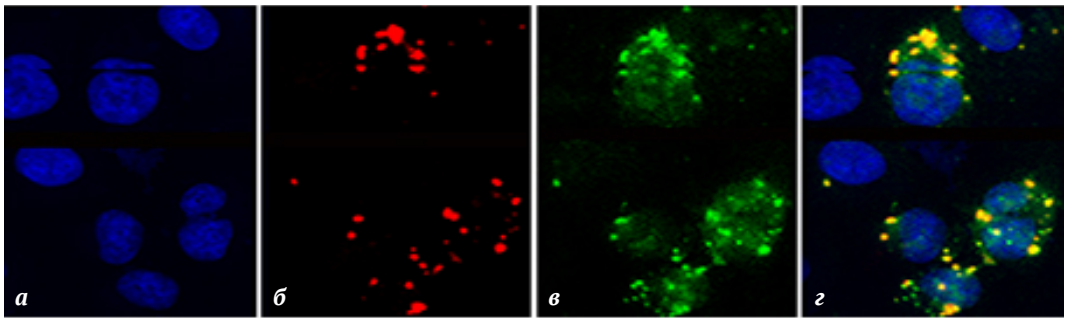


Рис. 1. Конфокальная лазерная микроскопия MDCK клеток после их инкубации с Si~siRNA; одна из цепей мечена флуоресцеином, другая — родамином. Клеточные ядра окрашены DAPI blue (*а*, синий цвет); родамин-меченная цепь (*б*, красный цвет); флуоресцеин-меченная цепь (*в*, зеленый цвет); суперпозиция каналов (*г*)

Противовирусную активность Si~siRNA в зараженных клетках MDCK изучали при концентрации 0,5 мМ по $SiNH_2$, что намного ниже их 50%-х токсических концентраций (TC_{50} = 38 мМ по $SiNH_2$) [5]. Эксперименты проводили так же, как описано в [4]. Результаты приведены на рис. 2.

$SiNH_2$ и контрольный Si~siRNA-SCR практически не подавляют репликацию вируса гриппа А, что свидетельствует о высокой специфичности воздействия созданных нанокомплексов. Одноцепочечные фрагменты обеих молекул siRNA были менее эффективными по сравнению с двухцепочечными молекулами. Нанокомплексы Si~siRNA3/4 и Si~siRNA1/2 оказались эффективными ингибиторами репликации вируса. Индексы подавления продукции вируса под действием этих образцов составили 2,2 и 1,8 lg соответственно. Эффективность Si~siRNA3/4 оказалась сравнима с контрольным препаратом озельтамивиром.

Таким образом, показана высокая противовирусная активность нанокомплексов на основе немодифицированных siRNA и НЧ аминопропилсиланола против вируса гриппа A/H5N1 в клеточной системе. Полученные результаты указывают на перспективность использования НЧ для доставки siRNAs в клетки, способных эффективно предотвращать гидролиз siRNA в составе нанокомплекса.

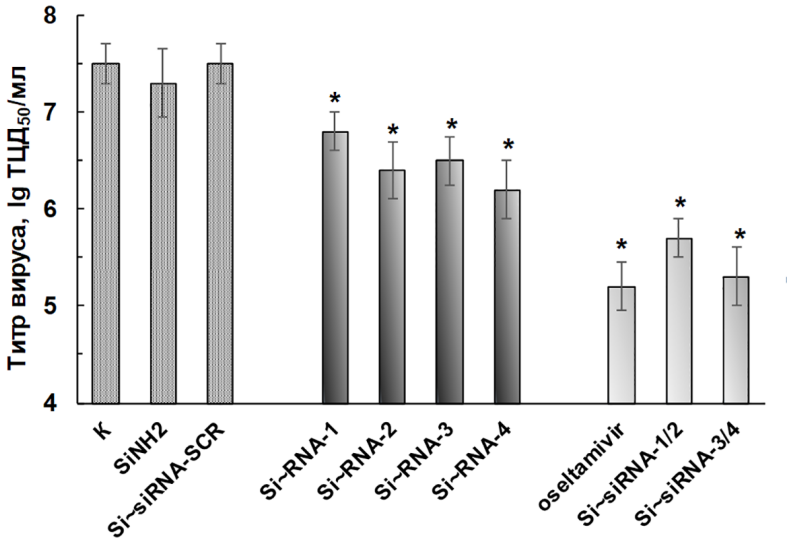


Рис. 2. Противовирусная активность образцов в отношении A/H5N1. Концентрации: siRNA — 0,5 мкМ; $SiNH_2$ — 0,5 мМ; озельтамивир — 100 мкг/мл. K — титр вируса в клетках без образца. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений.
* — отличие от контроля (без образца) по методу Спирмена — Кербера, $p \leqslant 0{,}05$

Литература

1. Clipp A., Burger M., Leroux J. C. Get out or die trying: Peptide- and protein-based endosomal escape of RNA therapeutics // Adv. Drug Deliv. Rev. 2023. Vol. 200. P. 115047.

2. Repkova M., Mazurkov O., Filippova E. et al. Effect of modification of siRNA molecules delivered with aminopropylsilanol nanoparticles on suppression of A/H5N1 virus in cell culture // BBA — Gen. Sub. 2024. Vol. 1868. P. 130727.

3. Ge Q., McManus M. T., Nguyen T. et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100 (5). P. 2718–2723.

4. Levina A. S., Repkova M. N., Shikina N. V. et al. Non-agglomerated silicon–organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties // Beilstein J. Nanotechnol. 2018. Vol. 9. P. 2516–2525.

5. Репкова М. Н., Левина А. С., Мазурков О. Ю. и др. Подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 in vitro с помощью нанокомплексов, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2024. Т. 101 (6). С. 794–802.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-222

ДОЗОЗАВИСИМЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫМИ АНТИГЕНАМИ ВИРУСА ДЕНГЕ

DOSE-DEPENDENT HUMORAL IMMUNE RESPONSE AND VIRUS-NEUTRALIZING ACTIVITY OF SERA OBTAINED BY IMMUNIZATION WITH RECOMBINANT DENGUE VIRUS ANTIGENS

Н. С. Савельев, Ю. В. Плетюхина, Г. М. Игнатьев, С. А. Аракелов, А. П. Савельева, Д. Н. Поляков, В. С. Лемешева, В. С. Грудина, А. С. Романов, М. Э. Кахина Харкин, А. А. Ячменева, С. О. Рабдано

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России

N. S. Savelev, I. V. Pletiukhina, G. M. Ignatyev, S. A. Arakelov, A. P. Saveleva, D. N. Polyakov, V. S. Lemesheva, V. S. Grudina, A. S. Romanov, M. E. Cajina Jarquin, A. A. Yachmeneva, S. O. Rabdano

Saint Petersburg Scientific and Research Institute of Vaccines and Serums FMBA of Russia

✉ n.s.saveliev@niivs.ru

Аннотация

Изучена иммуногенность рекомбинантных поверхностных и капсидных антигенов вируса денге (DENV). Продемонстрирован дозозависимый гуморальный ответ, предварительно показана вируснейтрализующая активность сывороток. Подтверждена перспективность антигенов для создания вакцины против денге с минимальным риском антителозависимого усиления инфекции (ADE).

Abstract

The immunogenicity of recombinant dengue virus (DENV) surface and capsid antigens was studied. A dose-dependent humoral response and preliminary virus-neutralizing activity of sera were demonstrated. The antigens show promise for developing a dengue vaccine with minimal risk of antibody-dependent enhancement (ADE).

Введение

Лихорадка денге — одна из наиболее распространенных трансмиссивных инфекций. Переносчики инфекции встречаются более чем в 100 странах, и она угрожает почти половине населения планеты [1]. Тяжелые формы болезни, такие как геморрагическая лихорадка денге, часто приводят к летальным исходам. В настоящее время отсутствует доступная и эффективная против всех четырех серотипов денге, которая была бы безопасна для людей, серонегативных по отношению к вирусу денге [2]. Таким образом, требуется разработка новых вакцинных кандидатов. Перспективной стратегией является использование рекомбинантных антигенов: поверхностных, индуцирующих нейтрализующие антитела, и внутренних капсидных белков, активирующих преимущественно клеточный иммунитет и минимизирующих риск антителозависимого усиления инфекции [3, 4].

Цель исследования — продемонстрировать эффективность и дозозависимость иммунизации экспериментальными рекомбинантными С-химерным и Е-химерным антигенами вируса денге и показать, что даже однократная иммунизация индуцирует измеримый иммунный ответ.

Материалы и методы

Рекомбинантные белки вируса денге экспрессировали в *Escherichia coli* и очищали с использованием аффинной хроматографии. Группы мышей Balb/c иммунизировали внутримышечно с адъювантом по схемам: 100 мкг трехкратно (с интервалом 2 недели), 50 мкг трехкратно (с интервалом 2 недели), 100 мкг однократно. Контрольные группы получали плацебо или не иммунизировались (наивные). На 42-й день собирали сыворотку и определяли титры специфических IgG методом ИФА. Вируснейтрализующую активность определяли в клеточной культуре, вычисляя титр NT_{50} для каждого из четырех серотипов DENV.

Результаты

Полученные рекомбинантные антигены индуцировали выраженный дозозависимый гуморальный иммунный ответ. Титры антител к Е-антигену при трехкратной иммунизации превышали 10^4, при однократной — 10^3, что демонстрирует высокую иммуногенность даже после однократного введения. Капсидные антигены вызывали

© Н. С. Савельев, Ю. В. Плетюхина, Г. М. Игнатьев, С. А. Аракелов, А. П. Савельева, Д. Н. Поляков, В. С. Лемешева, В. С. Грудина, А. С. Романов, М. Э. Кахина Харкин, А. А. Ячменева, С. О. Рабдано, 2025

аналогично высокие титры антител. По полученным данным сыворотки к Е-антигену обладали нейтрализующей активностью в отношении всех четырех серотипов DENV. Исследования титров нейтрализующей активности сывороток к С- и Е-антигенам в классической реакции нейтрализации *in vitro* продолжаются.

Обсуждение

Полученные результаты подтверждают иммуногенность и дозозависимый характер ответа при использовании рекомбинантных антигенов денге. Поверхностный химерный антиген показал перспективу создания тетравалентной вакцины с высокой нейтрализующей активностью, однако его использование связано с риском ADE, характерным для вируса денге. Внутренний капсидный антиген, напротив, представляет собой перспективную альтернативу, так как не индуцирует ADE и активирует клеточно-опосредованный иммунитет аналогично нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2, успешно использованному в вакцине «Конвасэл» [5]. Доказано, что иммунитет, индуцированный капсидным антигеном, эффективно защищает животных от развития болезни, несмотря на отсутствие нейтрализующих антител, что предполагает иной механизм защиты, основанный на клеточном иммунитете.

Заключение

Показана высокая иммуногенность вакцин и вируснейтрализующая активность сывороток при иммунизации мышей рекомбинантными антигенами вируса денге. Использование как поверхностных, так и капсидных антигенов имеет значительный потенциал в создании вакцин против вируса денге с минимизацией рисков ADE. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения эффективности и безопасности разрабатываемых вакцинных конструкций.

Литература

1. Bhatt S. et al. The global distribution and burden of dengue // Nat. 2013. Vol. 496 (7446). P. 504–507.

2. Murphy B. R., Whitehead S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine // Annu. Rev. Immunol. 2011. Vol. 29 (1). P. 587–619.

3. Leng C.-H. et al. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity // Microbes Infect. 2009. Vol. 11 (2). P. 288–295.

4. Izquierdo A. et al. A tetravalent dengue vaccine containing a mix of domain III-P64k and domain III-capsid proteins induces a protective response in mice // Arch. Virol. 2014. Vol. 159 (10). P. 2597–2604.

5. Rabdano S. O. et al. Immunogenicity and in vivo protective effects of recombinant nucleocapsid-based SARS-CoV-2 vaccine Convacell® // Vaccines. 2023. Vol. 11 (4). P. 874.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-223

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА С, У СУБТИПОВ 1В И 3А*

PREVALENCE OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE OF HEPATITIS C VIRUS IN SUBTYPES 1B AND 3A

К. А. Свирин[1], О. Г. Половкова[2], Е. С. Федорова[2], А. С. Железнова[1], М. Ю. Карташов[1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Томский фтизиопульмонологический медицинский центр*

K. A. Svirin[1], O. G. Polovkova[2], E. S. Fedorova[2], A. S. Zheleznova[1], M. Yu. Kartashov[1]

[1] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*
[2] *Tomsk Phthisiopulmonological Medical Center*

✉ svirin_ka@vector.nsc.ru

Аннотация

Высокая частота мутаций вируса гепатита С (ВГС) обуславливает возникновение резистентных вариантов, устойчивых к воздействию противовирусной терапии. Среди 57 изолятов ВГС субтипа 3а в гене NS3 были обнаружены мутации A166S/T и I170V, в гене NS5A — A30K/S, S62L, Y93H, в NS5B — A150V и K206E. У 17 изолятов субтипа 1b в гене NS3 обнаружены мутации Y56F, S122G, V170I, в гене NS5A — R30Q, L31M, P58S, Y93H, в гене NS5B — L150F, C316, M414L, S556G.

Abstract

The high frequency of hepatitis C virus (HCV) mutations causes the emergence of resistant variants resistant to the effects of antiviral therapy. Among 57 HCV subtype 3a isolates, mutations A166S/T and I170V were found in the NS3 gene, A30K/S, S62L, Y93H in the NS5A gene, and A150V and K206E in NS5B. Mutations Y56F, S122G, and V170I were found in 17 isolates of subtype 1b in the NS3 gene, R30Q, L31M, P58S, and Y93H in the NS5A gene, and L150F, C316, M414L, and S556G in the NS5B gene.

Гепатит С (ГС) — воспалительное инфекционное заболевание печени вирусной природы, являющееся важной медицинской и социальной проблемой здравоохранения во всем мире. Возбудителем ГС является вирус гепатита С (ВГС), который относится к роду *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*. Без надлежащего лечения ГС может приводить к серьезным поражениям печени, таким как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. В отличие от гепатитов А и В, для которых существуют эффективные вакцины, создание вакцины против ГС является сложной задачей из-за высокой генетической изменчивости вируса. Поэтому основная стратегия борьбы с ГС основана не на вакцинной профилактике, а на применении противовирусной терапии. Прогресс в изучении молекулярной структуры белков вируса и их функций позволил создать противовирусные препараты прямого действия (ППРД). Эти препараты действуют непосредственно на неструктурные белки вируса, блокируя ключевые этапы его репликации. С появлением этих препаратов произошел прорыв в терапии ГС, так как они оказались высокоэффективными и имели малое количество побочных эффектов. Современные схемы терапии на основе комбинаций ППРД позволяют достичь полной эрадикации вируса более чем у 95 % пациентов. Однако препятствием для полного искоренения ГС является его высокая мутационная изменчивость, которая приводит к формированию мутаций резистентности.

Цель работы заключалась в оценке распространенности аминокислотных замен, которые приводят к развитию резистентности к препаратам у различных генотипов ВГС.

Исследование проведено на 308 образцах плазмы крови, полученных от пациентов, инфицированных туберкулезом. Проведено генотипирование выделенных изолятов ВГС по гену *core*. Для части изучаемых изолятов субтипов 1b и 3a были определены нуклеотидные последовательности генов NS3, NS5A, NS5B с последующим анализом наличия в них мутаций резистентности к ППРД. Обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ MEGA XII.

Распределение субтипов в группе составило: 1b — 43,5 % (134/308; 95 % ДИ: 37,9–49,2), 3a — 42,2 % (130/308; 95 % ДИ: 36,6–47,9), 1a — 12,3 % (38/308; 95 % ДИ: 8,9–16,5), рекомбинантная форма 2k/1b — 1,0 % (3/308; 95 % ДИ: 0,2–2,8), 2a — 1,0 % (3/308; 95 % ДИ: 0,2–2,8).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора № 2/22 (№ 1220406001563 в ЕГИСУ НИОКТР).

© К. А. Свирин, О. Г. Половкова, Е. С. Федорова, А. С. Железнова, М. Ю. Карташов, 2025

Анализ 57 изолятов субтипа 3a на наличие мутаций резистентности показал, что в гене NS3 у 12 изолятов была обнаружена замена A166S/T (21,1 %) и у шести — I170V (10,5 %). В гене NS5A один изолят имел замену Y93H (4 %), семь изолятов содержали замены S62L (12,3 %), три изолята — A30K/S (5,3 %). В гене NS5B были обнаружены мутации A150V у 16 изолятов (28,1 %) и K206E у шести изолятов (10,5 %), комбинация мутаций A150V и K206E — у семи изолятов (12,3 %).

Среди 17 изолятов субтипа 1b в гене NS3 были обнаружены мутации S122G в единичном случае (5,9 %), V170I — у трех изолятов (17,7 %). Один из изолятов с мутацией V170I также содержал Y56F (5,9 %). В гене NS5A были обнаружены замены L31M, P58S, которые были найдены у двух разных изолятов (5,9 %), а также Y93H и R30Q, которые были найдены совместно у одного изолята (5,9 %). В NS5B были обнаружены мутации L159F у семи изолятов (41,2 %) и C316 у восьми (47,1 %). Все изоляты с L159F также содержали мутацию C316N. Также выявлены мутации M414L у одного изолята (5,9 %) и S556G у четырех (23,5 %). Один генетический вариант имел сочетание трех мутаций L150F, C316N, S556G (5,9 %).

Внедрение ПППД в клиническую практику стало прорывом в лечении ГС. Эти препараты превратили трудноизлечимую хроническую инфекцию в заболевание, которое можно полностью ликвидировать. Современные терапевтические схемы позволяют достигать УВО даже у пациентов с ЦП и ГЦК, инфицированных ВИЧ, ВГВ, туберкулезом. Важной задачей остается реализация программы ВОЗ, основная цель которой сократить к 2030 г. число новых случаев инфицирования вирусными гепатитами на 90 %, а смертность от них — на 65 %.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-224

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ ДНК-ВАКЦИН, КОДИРУЮЩИХ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ПОЛИЭПИТОПНЫЙ ИММУНОГЕН И ПОЛИПРОТЕИН PRM-E ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *

IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES OF BICOMPONENT DNA VACCINES ENCODING T-CELL POLYEPITOPE IMMUNOGEN AND PRM-E POLYPROTEIN OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Е. В. Тигеева, В. А. Яковлев, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, Е. В. Протопопова, В. А. Святченко, В. Б. Локтев, Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко

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

E. V. Tigeeva, V. A. Yakovlev, E. V. Starostina, M. B. Borgoyakova, E. V. Protopopova, V. A. Svyatchenko, V. B. Loktev, L. A. Kisakova, D. N. Kisakov, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ lena.tigeeva@gmail.com

Аннотация

В ходе работы были созданы две двухкомпонентные ДНК-вакцины, кодирующие Т-клеточный полиэпитопный иммуноген и полипротеин prM-E вируса клещевого энцефалита. Было показано, что двухкомпонентные ДНК-вакцины — pVAX-prM-E+pVAX-AG1-ub, а также pVAX-prM-E+pVAX-AG4-ub — эффективно индуцируют формирование высокого уровня защитного иммунитета у иммунизированных животных.

Abstract

In the study, bicomponent DNA-vaccines encoding T-cell polyepitope immunogen and prM-E polyprotein of tick-borne encephalitis virus were developed. It was shown that two-component DNA vaccines — pVAX-prM-E+pVAX-AG1-ub, as well as pVAX-prM-E+pVAX-AG4-ub, effectively induce a high level of protective immunity in immunised animals.

Вирус клещевого энцефалита (КЭ) — опасный нейротропный патоген, поражающий центральную нервную систему. Эффективным способом борьбы с КЭ является вакцинация. Лицензированные вакцины, полученные на основе инактивированного вируса КЭ, продемонстрировали эпидемиологическую эффективность, однако они обладают рядом недостатков, среди которых следует отметить отдельные случаи прорывных инфекций у вакцинированных. Одной из причин этого явления может быть недостаточно эффективное формирование Т-клеточного иммунного ответа на инактивированный вирус.

Одним из перспективных подходов к разработке средств профилактики КЭ могут стать ДНК-вакцины, которые обеспечивают синтез антигена в нативной форме, способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный ответ. Производство ДНК-вакцин является более простым и дешевым по сравнению с традиционными вакцинами.

Повышение эффективности ДНК-вакцины может быть достигнуто за счет применения комплексной стратегии, заключающейся в одновременном использовании двух иммуногенов: один из которых предназначен для стимуляции Т-клеточного ответа, а другой — для индукции вируснейтрализующих антител.

Целью работы являлся анализ иммуногенных и протективных свойств двухкомпонентных ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопный Т-клеточный иммуноген и полипротеин prM-E вируса КЭ.

Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были получены ДНК-вакцины pVAX-AG1-ub и pVAX-AG4-ub, кодирующие Т-клеточные полиэпитопные иммуногены AG1 и AG4, в состав которых входят цитотоксические и Т-хелперные эпитопы из белков NS1, NS3, NS5 и E ВКЭ. Для индукции гуморального ответа была разработана ДНК-вакцина pVAX-prM-E, кодирующая полипротеин вируса КЭ — структурные белки prM и E. Совместная экспрессия белков E и prM ведет к формированию вирусоподобных частиц, обладающих морфологией нативных вирионов, что позволяет сохранить природную конформацию эпитопов, узнаваемых вируснейтрализующими антителами.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 27/21).

© Е. В. Тигеева, В. А. Яковлев, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, Е. В. Протопопова, В. А. Святченко, В. Б. Локтев, Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, 2025

Иммуногенность и протективность полученных двухкомпонентных ДНК-вакцин оценивали на модели мышей линии Balb/c (протокол № 3, утвержденный Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» от 29.02.2024). Для этого была проведена иммунизация животных по схеме, представленной на рис. 1.

Оценку уровня гуморального ответа проводили с помощью ИФА на 14-й день после второй иммунизации. В результате было показано, что в сыворотках мышей, иммунизированных pVAX-prM-E, титр специфических антител составил 1 : 85,000, иммунизированных двухкомпонентными ДНК-вакцинами pVAX-prM-E+pVAX-AG1-ub — 1 : 94,000 и pVAX-prM-E+pVAX-AG4-ub — 1 : 164,000 (рис. 2, *а*).

Анализ Т-клеточного иммунного ответа с помощью метода ELISpot показал, что в группах мышей, иммунизированных двухкомпонентными ДНК-вакцинами — pVAX-prM-E+pVAX-AG1-ub, а также pVAX-prM-E+pVAX-AG4-ub, наблюдался высокий уровень спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов из белка Е вируса (см. рис. 2, *б*). В контрольных группах животных клеточный ответ был на уровне фона.

Для оценки способности вакцинных конструкций обеспечивать защиту животных от заражения вирусом, иммунизированных мышей, опытных и контрольных животных инфицировали дозой 1000 $ЛД_{50}$ ВКЭ (штамм 205 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Выживаемость в группах, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAX-prM-E, а также комбинированными ДНК-вакцинами и коммерческой вакциной «Клещ-Э-Вак», на 14-й день наблюдений составила 100 % (рис. 3).

Таким образом, показано, что иммунизация мышей линии Balb/c двухкомпонентными ДНК-вакцинами, кодирующими полиэпитопный Т-клеточный иммуноген и структурные белки вируса КЭ, индуцирует формирование высокого уровня как гуморального, так и Т-клеточного иммунного ответа. Включение в состав вакцины Т-клеточного иммуногена способствует повышению специфического Т-клеточного ответа у животных, иммунизированных двухкомпонентными вакцинами — pVAX-prM-E+pVAX-AG1-ub, а также pVAX-prM-E+pVAX-AG4-ub. Кроме того, было показано, что обе двухкомпонентные ДНК-вакцины способны эффективно индуцировать защитный иммунитет против ВКЭ (штамм 205).

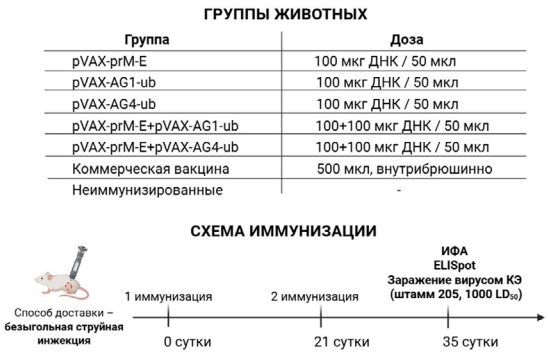


Рис. 1. Схема эксперимента

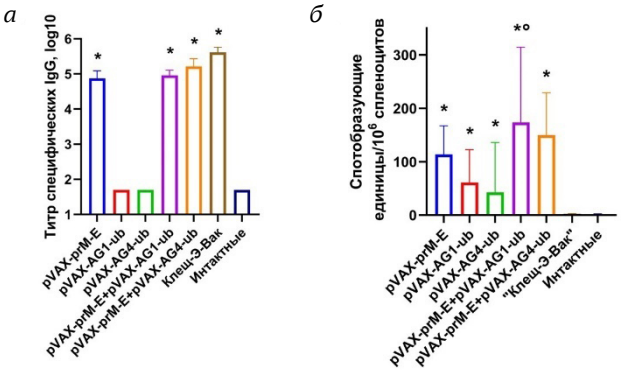


Рис. 2. Результаты оценки иммунного ответа у иммунизированных мышей линии Balb/c: *а* — титры специфических антител к вирусу КЭ (по данным ИФА); *б* — число клеток, продуцирующих IFNγ в ответ на специфическую стимуляцию (по данным ELISpot). Данные представлены как среднее с с. о. ($p < 0,05$ по сравнению: º — с pVAX-prM-E; * — с интактными мышами)

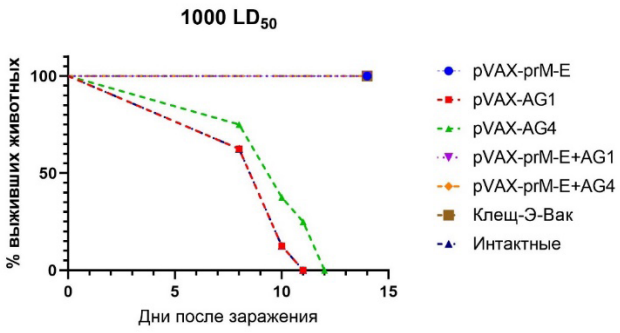


Рис. 3. Кривые выживаемости, полученные в группах иммунизированных животных после летального заражения вирусом КЭ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-225

СИНТЕЗ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИОРТОПОКСВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ БИЦИКЛИЧЕСКИХ МОНОТЕРПЕНОИДОВ КАМФОРЫ, ИЗОКАМФАНОНА И НОПОЛА *

SYNTHESIS OF NEW POTENTIAL ANTI-ORTHOPOXVIRUS COMPOUNDS BASED ON BICYCLIC MONOTERPENOID SCAFFOLDS OF CAMPHOR, ISOCAMPHANONE, AND NOPOL

С. А. Тищенко[1,2], А. С. Соколова[1], Ю. Г. Пушкарева[1,2], Н. И. Бормотов[3], Л. Н. Шишкина[3], Н. Ф. Салахутдинов[1]

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

S.A. Tishchenko[1,2], A. S. Sokolova[1], Yu. G. Pushkareva[1,2], N. I. Bormotov[3], L. N. Shishkina[3], N. F. Salakhutdinov[1]

[1]*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*
[2]*Novosibirsk State University*
[3]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ serafimtishchenko76621@gmail.com

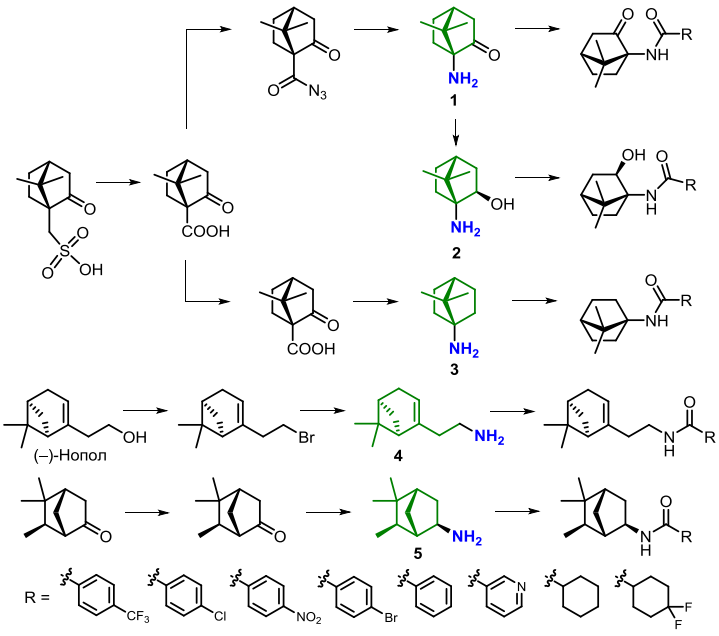
Аннотация

В связи с учащением вспышек оспы обезьян и появлением тековиримат-резистентных штаммов разработка новых антиортопоксвирусных препаратов остается критически важной задачей. В настоящей работе была синтезирована серия новых амидов, содержащих ароматический или циклогексановый фрагмент на основе аминов 1–3, нопиламина 4 и изокамфаниламина 5.

Abstract

Given the rising incidence of monkeypox outbreaks and emergence of tecovirimat-resistant strains, developing new anti-orthopoxvirus therapeutics is imperative. Herein, we synthesize a series of amides featuring aromatic or cyclohexanone moieties derived from amines 1–3, nopylamine 4, and isocamphanilamine 5.

Несмотря на принимаемые ВОЗ меры, вспышки инфекции, вызванной вирусом оспы обезьян (MPXV), продолжают регистрироваться в различных регионах мира [1]. Более того, в последние годы выявлены новые варианты MPXV, демонстрирующие устойчивость к тековиримату — одному из двух одобренных препаратов против оспы обезьян у людей [2, 3], что подчеркивает необходимость разработки новых противооспенных препара-



Синтез амидов на основе аминов 1–5, содержащих ароматический или циклогексановый фрагмент

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-73-00137).

© С. А. Тищенко, А. С. Соколова, Ю. Г. Пушкарева, Н. И. Бормотов, Л. Н. Шишкина, Н. Ф. Салахутдинов, 2025

тов. Ранее в лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН было показано, что амиды на основе борниламина, фенхиламина, содержащие ароматический или циклогексановый фрагмент, проявляют высокую противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов [4].

В настоящей работе мы продолжили поиск новых ингибиторов ортопоксвирусов на основе природных соединений, содержащих бициклический монотерпеноидный фрагмент. Был осуществлен синтез серии амидов на основе аминов 1–3, которые содержат 7,7-диметилбицикло[2.2.1]гептановый фрагмент, аналогичный по структуре бициклическому остову борниламина. Кроме того, были получены новые амиды на основе нопиламина 4 и изокамфаниламина 5, последний представляет особый интерес как структурный изомер борниламина и фенхиламина. Все синтезированные амиды содержали ароматический или циклогексановый фрагмент (см. рисунок). Для всех синтезированных соединений было проведено тестирование противовирусной активности в отношении вирусов осповакцины, оспы коров и эктромелии, в результате чего были обнаружены важные закономерности «структура — активность». Например, восстановление карбонильной группы в положении С-2 до гидроксильной и до метиленового фрагмента благоприятно для проявления противовирусного эффекта. Переход к остову изокамфанона также способствует улучшению противовирусной активности, в то время как переход к остову (-)-нопола приводит к увеличению токсичности. Таким образом, настоящая работа демонстрирует, что природные монотерпеноиды являются ценным источником для синтеза потенциальных антиортопоксвирусных агентов.

Литература

1. Janhavi A. et al. Is Southeast Asia and the Western Pacific ready for potential monkeypox virus outbreaks? // Lancet Regional Health–Western Pacific. 2025. Vol. 57.

2. Chenchula S. et al. Emerging variants of Mpox virus and Tecovirimat resistance: Genomic Insights and Implications for Treatment Strategies // Virology. 2025. P. 110532.

3. Vernuccio R. et al. Structural insights into tecovirimat antiviral activity and poxvirus resistance // Nat. Microbiol. 2025. Vol. 10. P. 734–748.

4. Sokolova A. S. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of (+)-Camphor-and (−)-Fenchone-Based Derivatives as Potent Orthopoxvirus Inhibitors // Chem. Med. Chem. 2022. Vol. 17 (12). P. e202100771.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-226

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ SARS-COV-2 В 2024–2025 ГОДАХ *

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS IN PATIENTS INFECTED WITH SARS-COV-2 IN 2024–2025

К. С. Трубенков, И. А. Драчкова, М. С. Мокроносов, Т. С. Тимохина, С. А. Боднев

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

K. S. Trubenkov, I. A. Drachkova, M. S. Mokronosov, T. S. Timohina, S. A. Bodnev

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ trubenkov.k@mail.ru

Аннотация

В условиях сезонного подъема заболеваемости респираторными вирусными инфекциями наблюдается существенное увеличение риска коинфицирования с SARS-CoV-2, что может оказывать влияние на патогенез, клиническое течение заболевания, своевременную диагностику и прогноз развития заболевания. Цель работы — изучить случаи сочетанной инфекции COVID-19 и сезонных ОРВИ на территории Урала, Сибири и Дальнего Востока.

Abstract

In the context of a seasonal increase in the incidence of respiratory viral infections, there is a significant increase in the risk of co-infection with SARS-CoV-2, which can affect the pathogenesis, clinical course of the disease, timely diagnosis and prognosis of the development of the disease. The purpose of the work is to study cases of combined infection with COVID-19 and seasonal acute respiratory viral infections in the Urals, Siberia and the Far East.

Вирусная коинфекция — это практически одновременное заражение организма двумя или более различными видами вирусов, что приводит к их взаимному влиянию на иммунную систему хозяина, изменяя тяжесть инфекционного процесса.

Согласно последним исследованиям, респираторная коинфекция утяжеляет клиническую картину, вызывая более выраженную потерю веса и более тяжелую и продолжительную пневмонию. Так, в исследовании Bai L. et al. [1] показано, что коинфекция *in vivo* вирусом гриппа А приводит к повышению вирусной нагрузки SARS-CoV-2 и более серьезному поражению легких. В противоположность этому, результаты другого эксперимента [2] говорят о том, что подобная респираторная вирусная коинфекция не вызывает более тяжелого течения заболевания. Вирус гриппа А значительно подавляет репликацию SARS-CoV-2 без снижения собственной продукции [3].

Также было отмечено, что респираторно-синцитиальный вирус человека, вирус парагриппа человека и риновирус человека не оказывали влияния на инфекционность SARS-CoV-2 [1], а смешанная инфекция человеческого аденовируса 5-го типа никак не повлияла на репликацию SARS-CoV-2 при одновременном коинфицировании [3].

В работе были исследованы 198 образцов, полученные от пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 тяжелого течения или с летальным исходом из 21 региона РФ с июня 2024 по апрель 2025 г.

Выделение нуклеиновых кислот осуществляли с использованием набора «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия). Наличие генетического материала вируса SARS-CoV-2 в исследуемых образцах подтверждали с помощью набора «Вектор-ПЦР$_{РВ}$-2019-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Для выявления и дифференциации специфических фрагментов нуклеиновой кислоты возбудителей ОРВИ (респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1–4-го типов, коронавирусов видов OC43, E229, NL63, HKU1, риновирусов, аденовирусов групп B, C, E и бокавируса) был использован набор «ОРВИ-скрин-FL» («АмплиСенс», Россия). Для качественного определения и дифференциации РНК вирусов гриппа А и гриппа В был использован набор реагентов Influenza virus A/B-FL («АмплиСенс», Россия). Реакции амплификации в этом исследовании были выполнены на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) согласно рекомендациям производителя диагностических наборов.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (№ 33/21).

© К. С. Трубенков, И. А. Драчкова, М. С. Мокроносов, Т. С. Тимохина, С. А. Боднев, 2025

По результатам исследования было выявлено 15 образцов с конфекцией SARS-CoV-2 и других респираторных вирусов, что составляет 7,58 % от общего числа проб. Отмечена зависимость возбудителей ОРВИ от региона. Респираторно-синцитиальный вирус человека был обнаружен в 3 (13,6 %) из 22 исследованных образцов, полученных из Кемеровской области. Сезонный коронавирус был выявлен в 4 (12,5 %) из 32 исследованных образцов, полученных из Свердловской области. В 3 из 13 проб (23,1 %) от пациентов с COVID-19 из Приморского края был детектирован образец, содержащий маркеры сезонной коронавирусной и риновирусной инфекций. Среди проб с выявленной коинфекцией доминировал вариант Омикрон JN.1.16.1 (76,9 %).

Все респираторные вирусы были идентифицированы в образцах с SARS-CoV-2 за февраль — март 2025 г., что отличается от зарегистрированных ранее пиковых показателей, приходящихся на март — апрель. Смещение сезонности предположительно обусловлено аномально теплой осенью 2024 г.

Коинфекция была выявлена во всех образцах, полученных от пациентов только с тяжелым течением COVID-19, что согласуется с литературными данными об утяжелении клинической картины течения заболевания.

Литература

1. Bai L. et al. Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity // Cell Res. Vol. 31, No. 4. P. 395–403.

2. Achdout H. et al. Increased lethality in influenza and SARS-CoV-2 coinfection is prevented by influenza immunity but not SARS-CoV-2 immunity // Nat. Commun. Vol. 12, No. 1. P. 5819.

3. Svyatchenko V. A. et al. Human Adenovirus and Influenza A Virus Exacerbate SARS-CoV-2 Infection in Animal Models // Microorganisms. Vol. 11, No. 1. P. 180.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-227

РАЗНООБРАЗИЕ СУБТИПОВ ВИРУСА ГРИППА А, ВЫЯВЛЕННЫХ У ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ *

DIVERSITY OF INFLUENZA A VIRUS SUBTYPES IDENTIFIED IN WILD WATERFOWL OF THE AMUR REGION

А. Б. Хорчун[1], А. А. Дёрко[2], Н. А. Дубовицкий[2], М. А. Андрияш[3], К. А. Шаршов[2,4]

[1]*Новосибирский государственный педагогический университет*
[2]*Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[3]*Управление по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира и среды их обитания Амурской области, Благовещенск*
[4]*Новосибирский государственный университет*

A. B. Khorchun[1], A.A. Derko[2], N. D. Dubovitskiy[2], M.A. Andriyash[3], K.A. Sharshov[2,4]

[1]*Novosibirsk State Pedagogical University*
[2]*Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[3]*Department for the Protection, Control and Regulation of the Use of Wildlife and Their Habitats of the Amur Region, Blagoveshchensk*
[4]*Novosibirsk State University*

✉ ayzakhorchun.12@mail.ru

Аннотация

Вирусы гриппа А (ВГА) являются широко распространенными патогенами среди диких и домашних птиц, способными преодолевать межвидовой барьер. В настоящем исследовании мы приводим результаты трехлетнего мониторинга вирусов гриппа А у диких водоплавающих птиц Амурской области. Было получено 16 изолятов ВГА, относящихся к 6 различным субтипам: H3N6, H3N8, H4N6, H5N3, H6N2 и H6N6. Все субтипы были выявлены у птиц рода *Anas*, сем. *Anatidae*.

Abstract

Influenza A virus (IAV) is a widespread pathogen among wild and domestic birds, capable of overcoming the interspecies barrier. In this study, we present the results of a three-year monitoring of influenza A viruses in wild waterfowl of the Amur Region. Sixteen IAV isolates were obtained, belonging to six different subtypes: H3N6, H3N8, H4N6, H5N3, H6N2 and H6N6. All subtypes were detected in birds of the genus *Anas*, family *Anatidae*.

Вирусы гриппа А (вид *Alphainfluenzavirus influenzae*, сем. *Orthomyxoviridae*) имеют важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение, вызывая заболевание с высокой смертностью у домашних птиц, что влечет за собой экономические потери в сфере птицеводства, и у диких, тем самым угрожая биоразнообразию видов. За последние два десятилетия погибло более 630 млн птиц [1], зарегистрировано множество случаев заражения млекопитающих, в том числе и людей разными субтипами вируса. Дикие водоплавающие птицы, являющиеся природными резервуарами ВГА, распространяют вирус на большие географические расстояния в процессе миграции, что обеспечивает разнообразие и эволюцию вируса. Экология и эпидемиология ВГА являются сложными процессами, и, таким образом, должное наблюдение, контроль и мониторинг ВГА все еще остаются важнейшими мерами профилактики и борьбы с распространением птичьего гриппа.

Материалы и методы

Сбор материала производился с 2019 по 2021 г. на территории Амурской области в осенний период во время официального сезона охоты. Клоакальные мазки диких птиц были подготовлены для инокуляции в развивающиеся куриные эмбрионы согласно стандартной методике [2]. Затем аллантоисная жидкость была проверена на наличие гемагглютинирующей активности в РГА [3]. Выявление ВГА проводили методом ПЦР с набором реактивов «МБС-грипп А», (Медико-биологический союз, Россия) по протоколу производителя. Для определения субтипа H5N1 использовали набор Influenza virus A H5N1-FL («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН (№ 122012400086-2).

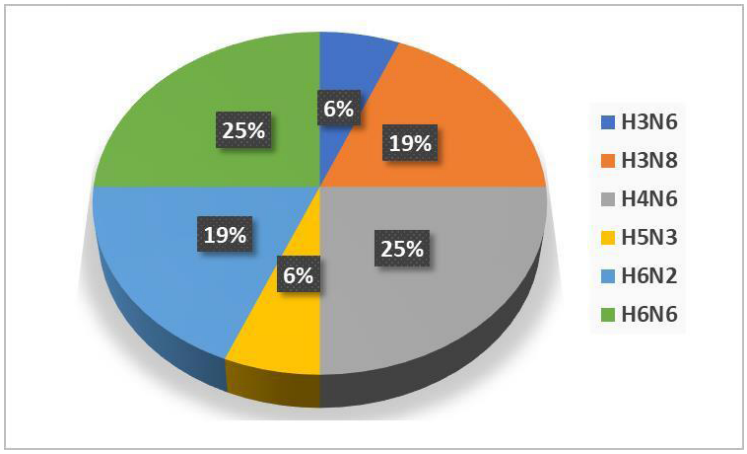
© А. Б. Хорчун, А. А. Дёрко, Н. А. Дубовицкий, М. А. Андрияш, К. А. Шаршов, 2025

производителя. Нуклеотидные последовательности геномов ВГА получали на платформе Miseq (Illumina, США) по протоколу, описанному ранее [4].

Результаты

В рамках исследования вируса гриппа А в Амурской области в 2019–2021 гг. было собрано 373 пробы от диких птиц. Выборка была представлена тремя отрядами: *Anseriformes* (98,4 %), *Charadriiformes* (0,8 %) и *Galliformes* (0,8 %). Самыми многочисленными были следующие виды птиц: чирок-свистунок (*Anas crecca*) 37 % (*n* = 138), кряква обыкновенная (*Anas platyrhynchos*) 36,5 % (*n* = 136) и утка серая (*Anas strepera*) 21 % (*n* = 78).

В результате культивирования было выявлено 52 образца с гемагглютинирующей активностью. Методом ПЦР вирус гриппа А был обнаружен в 22 образцах. В 29 образцах были выявлены авулавирусы птиц (подсем. *Avulavirinae*, сем. *Paramyxoviridae*). При помощи массового параллельного секвенирования были установлены полногеномные нуклеотидные последовательности 16 изолятов ВГА. Разнообразие ВГА было представлено шестью субтипами (см. рисунок).



Разнообразие субтипов вируса гриппа А, выявленных у диких водоплавающих птиц Амурской области в 2019–2021 гг.

Процент выделения ВГА у диких водоплавающих птиц Амурской области составил 5,9 % (95 % ДИ: 3,51–8,29 %, нормальная аппроксимация). Предыдущие исследования в азиатской части России показали сходные результаты. В Республике Якутия за шесть лет исследований процент выделения ВГА у диких птиц составил 3,76 % [5]. В Новосибирской и Сахалинской областях в 2021 г. этот показатель составил 6,94 и 4,61 % соответственно [6]. При этом разнообразие субтипов вируса гриппа А в азиатской части России было сопоставимо с результатами нашего исследования: в Якутии было обнаружено 7 сочетаний гемагглютинина и нейраминидазы, в Новосибирской области — 10, а на о. Сахалин выявлено 5 субтипов ВГА.

Литература

1. World Organisation for Animal Health. The State of the World's Animal Health 2025. Paris, 2025. P. 20–27.

2. Avian Influenza — WOAH — World Organisation for Animal Health. URL: https://www.woah.org/en/disease/avian-influenza/ (accessed: 15.05.2025).

3. Killian M. L. Hemagglutination assay for influenza virus // Methods Mol. Biol. 2014. Vol. 1161. P. 3–9.

4. Murashkina T., Sharshov K., Gadzhiev A. et al. Avian Influenza Virus and Avian Paramyxoviruses in Wild Waterfowl of the Western Coast of the Caspian Sea (2017–2020) // Viruses. 2024. Vol. 16. P. 598.

5. Kasianov N., Sharshov, K., Derko A. et al. Exploring Avian Influenza Viruses in Yakutia — The Largest Breeding Habitat of Wild Migratory Birds in Northeastern Siberia // Viruses. 2025. Vol. 17. P. 632.

6. Sharshov K., Dubovitskiy N., Derko A. et al. Does Avian Coronavirus Co-Circulate with Avian Paramyxovirus and Avian Influenza Virus in Wild Ducks in Siberia? // Viruses. 2023. Vol. 15. P. 1121.

РАЗДЕЛ V

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-228

A FUNCTIONAL POLYMORPHISM IN THE MOUSE *TH* GENE ALTERS TYROSINE HYDROXYLASE ACTIVITY AND MIDBRAIN DOPAMINE LEVELS *

I. Alsalloum[1,2], I.A. Rakhov[1], D.V. Bazovkina[1], A.V. Kulikov[1]

[1]*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Novosibirsk State University*

✉ ismailalsalom7@gmail.com

Abstract

A C886T (R278H) polymorphism in the mouse *Th* gene reduces tyrosine hydroxylase enzymatic activity and dopamine levels in the midbrain without altering Th mRNA or protein expression. Computational predictions, allele-specific genotyping, and HPLC-based biochemical assays support a functional impact of this variant on dopamine biosynthesis.

The dopaminergic (DA) system plays a pivotal role in regulating the nervous system, endocrine function, and both adaptive and pathological behaviors [1]. Catecholamine biosynthesis begins with the amino acid L-tyrosine: tyrosine hydroxylase (TH) catalyzes its conversion to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), which is then decarboxylated to dopamine (DA) by aromatic amino acid decarboxylase. DA can be further metabolized to norepinephrine (NE) by dopamine β-hydroxylase, and subsequently to epinephrine (Epi) by phenylethanolamine N-methyltransferase. Thus, TH-mediated hydroxylation of L-tyrosine represents the rate-limiting step in the biosynthesis of DA, NE, and Epi in both central nervous system neurons and adrenal chromaffin cells. Mutations in the human TH gene have been linked to childhood parkinsonism [2], dystonia [3], and bipolar disorder [4], underscoring its pathophysiological relevance.

The Ensembl genome database (https://www.ensembl.org) lists 21 nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mouse *Th* gene. To assess the potential functional significance of these SNPs, we evaluated their predicted impact on TH protein stability using three in silico tools: I-Mutant, MUpro, and SAAFEC-SEQ. These tools generate ΔΔG values, which quantify the change in protein stability resulting from single-point mutations. Mutations with $\Delta\Delta G < -0.5$ were selected for further analysis.

Allele-specific primers were designed to identify polymorphisms distinguishing CAST/EiJ and C57BL/6 mouse strains. One such SNP, C886T (R278H), was identified: C57BL/6 mice carry the 886T allele, while CAST/EiJ mice carry the 886C allele.

This study investigates the functional consequences of the C886T mutation on TH activity in the mouse midbrain, where dopaminergic neuron cell bodies are located.

Male C57BL/6 (886T/T), CAST/EiJ (886C/C) were used. F2 intercrosses were generated by crossing C57BL/6 and CAST/EiJ mice. To introgress the 886C allele into the C57BL/6 background, ten successive backcrosses were performed. Intercrossing of BC10×BC10 animals produced mice of all three genotypes (CC, TC, TT). Genotyping was performed using allele-specific qPCR. TH enzymatic activity was measured by HPLC-based quantification of L-DOPA accumulation. Dopamine and its metabolites — homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) — were also quantified by HPLC in BC10×BC10 hybrids. *Th* mRNA and TH protein expression were analyzed by quantitative PCR and Western blot, respectively.

TH activity was significantly higher in CAST/EiJ (886C/C) midbrains compared to C57BL/6 (886T/T) mice ($p < 0.001$). However, no differences were observed in *Th* mRNA ($p = 0.11$) or protein levels ($p = 0.32$). In F2 intercrosses, TT mice exhibited significantly lower TH activity than CC or TC genotypes ($p < 0.05$), with no corresponding differenc-

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #25-25-00326).

© I. Alsalloum, I.A. Rakhov, D.V. Bazovkina, A.V. Kulikov, 2025

es in TH protein expression (p = 0.12). BC10×BC10 hybrids displayed a genotype-dependent gradient in TH activity: CC > TC > TT (p < 0.001). Midbrain DA levels were significantly higher in CC mice compared to TT and TC (p < 0.05), while HVA and DOPAC levels were not significantly different across genotypes.

The 886T allele lowers TH enzymatic activity and midbrain dopamine levels independently of transcript or protein expression changes, pointing to a functional (rather than transcriptional) defect. We propose that this SNP impairs TH's catalytic efficiency, stability, or post-translational regulation. Recombinant expression of the C886T variant would definitively test this hypothesis, clarifying its direct role in dopaminergic dysfunction.

References

1. Alsalloum I. et al. The C886T Mutation in the Th Gene Reduces the Activity of Tyrosine Hydroxylase in the Mouse Brain // Biochem. 2024. Vol. 89, No. 6. P. 1024–1030.

2. Bademci G., Vance J. M., Wang L. Tyrosine hydroxylase gene: another piece of the genetic puzzle of Parkinson's disease // CNS Neurol Disord Drug Targets. 2012. Vol. 11. P. 469–481.

3. Nagatsu T., Nakashima A., Ichinose H., Kobayashi K. Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders // J Neural Transm. 2019. Vol. 126. P. 397–409.

4. Craddock N., Davé S., Greening J. Association studies of bipolar disorder // Bipolar Disord. 2001. Vol. 3. P. 284–298.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-229

DEVELOPMENT OF ZIF-8 NANOCARRIERS FOR TARGETED INTRACELLULAR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS

Z. Hussein[1,2], S. R. Da Silva[2], I. P. Santos[2], J. P. Juste[2], G. B. González[2]

[1] *SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *CINBIO, University of Vigo, Spain*

✉ zain98hussein@gmail.com

Abstract

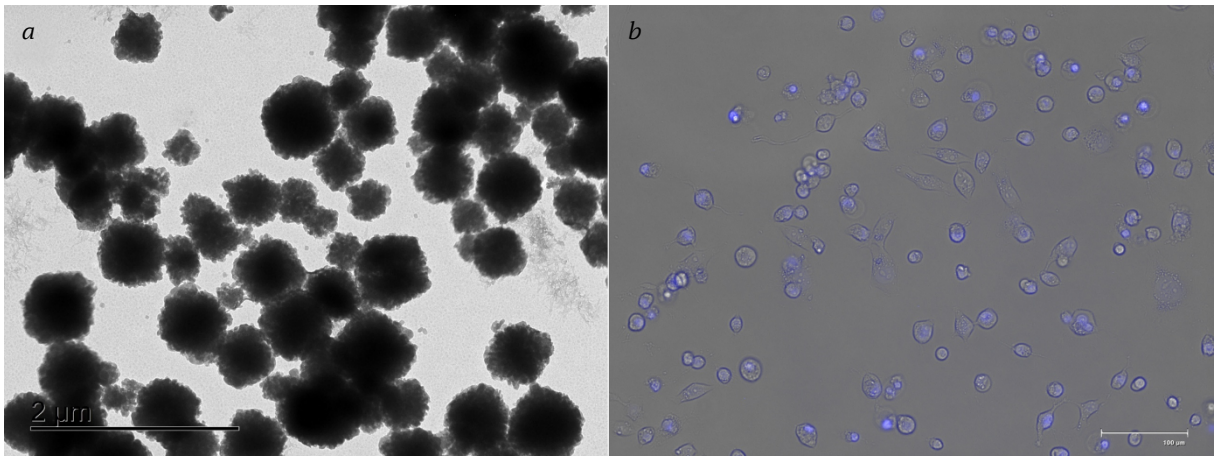
Gene therapy represents a promising strategy for cancer treatment, where the effective gene delivery plays a main role in the outcomes. Recently, metal–organic frameworks (MOFs) have gained attention as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. In this work, we focused on the delivery of a GFP-expressing plasmid using MOFs and its polyethyleneimine (PEI)-coated form, evaluating their potential as safe, accessible platforms for nucleic acid delivery.

Gene therapy offers a promising avenue for cancer treatment, but its success largely depends on the efficiency and safety of gene delivery systems. While viral vectors provide high transfection efficiency, they pose risks such as immune responses and organ toxicity. Nonviral vectors are safer and more biocompatible but often suffer from low specificity and transfection efficiency. Thus, the development of effective and safe nonviral delivery systems remains a critical challenge in advancing gene therapy [1].

Zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8), a member of the MOFs family, is being actively studied as a potential carrier for nucleic acid delivery. Its high surface area, adjustable pore structure, and ease of functionalization make it well-suited for encapsulating and releasing nucleic acids. The capacity for structural modification and pH-responsive release further enhances its appeal for gene therapy and other nucleic acid-based therapeutic strategies [2, 3].

In this study, nanoparticles were synthesized by mixing 2-methylimidazole with zinc nitrate and incubating for 3 hours. Transmission electron microscopy (TEM) revealed particles of varying sizes, with an average length of 350 nm (see figure, *a*). Plasmid (pcDNA3.1-GFP) encapsulation was assessed via agarose gel electrophoresis, showing near-complete encapsulation, as indicated by the absence of plasmid bands in the supernatant and retention in the MOF wells.

To evaluate transfection efficiency, MDA-MB-231 cells were treated with ZIF-8-based carriers encapsulating either pcDNA3.1-GFP (pcDNA3.1-GFP@ZIF-8 and pcDNA3.1-GFP@ZIF-8-PEI) or Hoechst 33258 as a control for cellular uptake (Hoechst-33258@ZIF-8). After 24 hours, nuclear staining confirmed internalization of Hoechst-loaded ZIF-8 (see figure, *b*), while no staining was observed during the initial 4 hours, suggesting uptake occurred only after internal-



Transmission electron microscopy image showing ZIF-8 nanoparticles with heterogeneous size distribution (*a*), fluorescence microscopy image of MDA-MB-231 cells displaying successful nuclear staining after 24-hour incubation with Hoechst-33258@ZIF-8 (*b*)

© Z. Hussein, S. R. Da Silva, I. P. Santos, J. P. Juste, G. B. González, 2025

ization, and no ZIF-8 were dissolved in the culture medium. Cells treated with pcDNA3.1-GFP@ZIF-8 showed no GFP expression, likely due to poor uptake caused by the material's near-neutral surface charge, as confirmed by zeta potential analysis. In contrast, cells treated with positively charged pcDNA3.1-GFP@ZIF-8-PEI showed low levels of GFP expression after 48 hours. Further optimization of used concentrations and transfection conditions is needed before comparing against commercial transfection agents.

The long-term objective is to adapt this system for therapeutic nucleic acids such as antisense oligonucleotides (ASOs) and small interfering RNAs (siRNAs) for cancer gene therapy.

References

1. Salari R. et al. P53 Gene Therapy with ZIF-8 Metal-Organic Framework: A Platform in Cancer Gene Therapy // ACS Omega. 2025. Vol. 10, No. 11. P. 10891–10902.

2. Polash S.A. et al. Phase Characterization and Bioactivity Evaluation of Nucleic Acid-Encapsulated Biomimetically Mineralized ZIF-8 // ACS Appl Mater Interfaces. 2025. Vol. 17, No. 2. P. 3002–3012.

3. Sameni M. et al. ZIF-8 Nanoparticle: A Valuable Tool for Improving Gene Delivery in Sperm-Mediated Gene Transfer // Biol Proced Online. 2024. Vol. 26, No. 1. P. 4.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-230

SELECTION OF NOVEL TARGET GENES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE-BASED THERAPY IN COLORECTAL CANCER *

K. S. Mantsurova[1], Z. Hussein[1], D. M. Kolpashchikov[2–4]

[1] *SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA*
[3] *Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA*
[4] *National Center for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA*

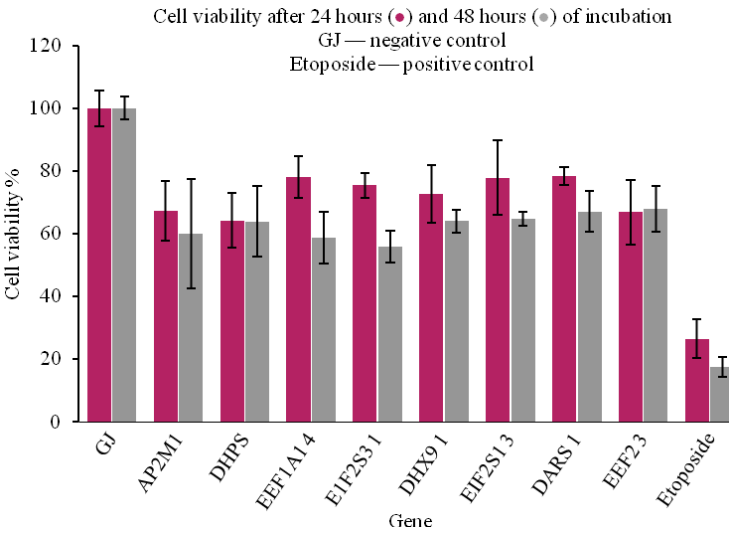
✉ mantsurova@scamt-itmo.ru

Abstract

Potential housekeeping genes were selected to test cytotoxicity of antisense oligonucleotides (ASOs) in colorectal cancer cells. Eight ASOs showed 33–44 % cell viability reduction in HCT-116 cell line. The agents that showed the greatest cytotoxicity were selected for further examinations.

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and colorectal cancer is one of the most aggressive and difficult cancers to treat. Traditional methods of its treatment, such as radiation and chemotherapy, are associated with side effects and a high probability of recurrence. In this regard, new methods and approaches in treatment are currently being developed. One of the potential methods is gene therapy, which makes it possible to inhibit tumor development using antisense oligonucleotides (ASO) that suppress the expression of housekeeping genes in cancer cells [1]. ASOs are short sequences of nucleic acids that selectively hybridize with the messenger RNA (mRNA) target, which activates RNase H1, which cleaves the ASO/RNA duplex. As a result of mRNA's cleavage, essential proteins encoded by this mRNA are not formed, which potentially leads to activation of programmed cell death — apoptosis [2]. One of the most significant challenges for cancer gene therapy is the choice of a suitable target that will lead to cell death instead of suppressing proliferation

The aim of this research is to investigate the cellular response to antisense oligonucleotides targeting housekeeping genes in HCT 116 cancer cell line (human colorectal carcinoma). To determine targets in HCT-116 cell line, online databases such as DepMap and OGEE, which provide information on essential genes in diverse cell lines, were used. As a result, the following 13 housekeeping genes were selected for further examinations: DHX8, DHX9, CSE1L, DARS1, DHPS, COPB1, AP2M1, DYNC1I2, EEF1A1, EEF2, EIF2S1, EIF2S3, PSMB2. To conduct primary screening of the targets MTT cytotoxicity test for 24- and 48-hours transfections was carried out. Based on obtained MTT results, 8 ASOs showed 32–44 % cell viability reduction and were selected for further secondary screening: AP2M1, DHPS, EEF1A1, E1F2S3, DHX9, DARS 1, EEF2 (see figure).



Results of MTT cytotoxicity test for the most efficient agents

Obtained results point out potential usage of ASOs in colorectal cancer treatment. Further experiments are going to be conducted to prove the efficiency of our selected ASOs, to confirm the gene knockdown, and to investigate the type of resulting cell death, in order to select the best agent to treat colorectal cancer.

References

1. Chan J. H., Lim S., Wong W. F. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2006. Vol. 33. P. 533–540.

2. Bennett C. F. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age // Annu. Rev. 2019. Vol. 70. P. 307–32.

* The study is supported by the "Priority 2030" Federal Academic Leadership Program.

© K. S. Mantsurova, Z. Hussein, D. M. Kolpashchikov, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-231

INTEGRATED APPROACH TO MONITORING MICROBIOLOGICAL CORROSION INDUCED BY SULFATE-REDUCING BACTERIA*

E. I. Mikheeva

Bioframework LLC, Saint Petersburg
byScoby LLC, Saint Petersburg

✉ ei.mikheeva@yandex.ru

Abstract

Sulfate-reducing bacteria (SRB) contribute to reducing the operational strength of industrial facilities, causing microbiological corrosion. Modern monitoring methods aim to apply rapid techniques for detecting the presence of microbiological corrosion and early inhibition strategies. These approaches also focus on analyzing corrosive bacteria consortia, including SRB species.

The development of molecular testing methods covers areas of biomonitoring to optimize existing methods for monitoring the negative effects of microorganisms on industrial facilities [1]. One example is corrosion caused by a consortium of bacteria, mainly represented by a heterogeneous group of sulfate-reducing bacteria that form biofilms and destroy steel [2]. Current approaches to monitoring include a cycle consisting of sampling, cultivation on the selective Postgate medium, qualitative analysis of iron sulfide formation, and initiation of treatment with bactericides. Recent studies on integrating quantitative polymerase chain reaction (PCR), consortium omics analysis, and quorum sensing of corrosive bacteria are relevant for optimizing on-site monitoring and analyzing microbial diversity for industrial needs [3].

An integral part of this monitoring approach is the subsequent processing of samples, molecular testing for the presence of dominant corrosive microorganisms, partially SRB, assessment of the corrosion level (from critical to moderate and satisfactory) and the selection of a bactericide specific to each strain. As a result, molecular test system have been developed with PCR determination of 6 strains of SRB, including the genera *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*. The selection of bactericides used in industry was based on open data that provides information about their effectiveness against specific strains.

The final integrated approach involves a combination of quantitative analysis of sulfate-reducing bacteria, selection of a suitable strain-specific bactericide for targeted treatment of industrial facilities, and further assessment of SRB distribution in sample collection sites, seasonality, and resistance development to bactericides.

References

1. Knisz J., Eckert R., Gieg L. M. et al. Microbiologically influenced corrosion — more than just microorganisms // FEMS Microbiol. Rev. 2023. Vol. 47, No. 5. P. 1–33.

2. Procópio L. The era of ‘omics’ technologies in the study of microbiologically influenced corrosion // Biotechnol. Lett. 2020. Vol. 42. P. 341–356.

3. Tripathi A. K., Thakur P., Saxena P. et al. Gene sets and mechanisms of sulfate-reducing bacteria biofilm formation and quorum sensing with impact on corrosion // Front Microbiol. 2021. Vol. 12, No. 754140.

* The study is supported by Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (grant #2748ГССС15-L/99789 from 10.09.2024)

© E. I. Mikheeva, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-232

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF NEW ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM MEDICINAL LEECH BY EXPRESSING THEIR CODING GENES IN *ESCHERICHIA COLI* *

M.Y. Serebrennikova[1,2], E.N. Grafskaia[2], K.A. Brovina[1,2], V.A. Manuvera[1,2], D.D. Kharlampieva[2], P.A. Bobrovsky[1,2], V.N. Lazarev[1,2]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow*

✉ serebrennikova.mu@phystech.edu

Abstract

The medicinal leech is an organism with a complex system for regulating its interactions with microorganisms. Its saliva contains a variety of molecules, including antimicrobial peptides. This study used a novel *recombinant genes expression*-based high-throughput screening method to identify new antimicrobial peptides finded in the *Hirudo medicinalis* genome.

The search for new methods to combat infectious diseases remains a relevant task for modern science. In this context, antimicrobial peptides (AMPs) represent great potential for the development of innovative approaches. The medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) is a rich source of bioactive molecules, yet its potential as a source of new AMPs remains largely untapped. This study aimed to investigate the antimicrobial properties of peptides found in the medicinal leech genome and determine their potential, using a novel primary screening method based on the expression of recombinant AMP genes in *Escherichia coli* [1]. This method allows for the direct detection of AMP activity within bacterial cells, bypassing the limitations and complexities of traditional peptide synthesis and purification methods.

BLAST analysis of the *H. medicinalis* genome revealed 10 sequences homologous to known AMPs: five to lumbricin (*Lumbricus rubellus*, UniProt ID: O96447), four to neuromycin (*H. medicinalis*, UniProt ID: A8V0B3) and one to theromycin (*H. medicinalis*, UniProt ID: A8I0L8). Upon confirming the correspondence between the sequences of the potential antimicrobial peptides found in the genome and real data, it was revealed that most peptides matched completely, with the exception of LBrHM11, for which two variants were identified. One of these variants (LBrHM11*) contained a single nucleotide polymorphism that led to the substitution of leucine (L) for proline (P).

The analysis itself does not provide information on real antimicrobial activity and requires experimental verification. We evaluated the antimicrobial properties of the expressed AMPs using two complementary detection methods: measuring the kinetic optical density (OD_{600}) in a liquid medium and drop-plating serial dilutions onto agar. OD600 measurement allows for the quantitative assessment of bacterial cell growth in the presence or absence of an AMP gene transcription inducer. Drop plating of serial dilutions, on the other hand, allows for a visual assessment of bacterial colony density, making it possible to detect even the weakest antimicrobial activity. Combining these approaches increases the reliability of the results and provides a comprehensive assessment of the antimicrobial potential. Among lumbricin homologues, only LBrHM1 exhibited significantly higher antimicrobial activity than lumbricin I (UniProt ID O96447) [2], comparable to the activity of the well-known AMP melittin. For peptides from the macin group, however, the observed effect was less pronounced, remaining at the level of positive control peptides.

The sequence of lumbricin LBrHM1 was examined in detail based on the antimicrobial activity analysis, with a particular focus on the unique N-terminal fragment LBrHM1(1-23) and the fragment LBrHM1(27-55). LBrHM1 was selected for further study due to its unique activity profile. Furthermore, the presence of a region with no analogues in known antimicrobial peptide databases in the LBrHM1 sequence presents additional interest for research. The N-terminal fragment LBrHM1(1-23) exhibited high activity against *E. coli* and *B. subtilis*, whereas LBrHM1(27-55) predominantly acted against *B. subtilis*. This indicates that the different peptide regions contribute differently to the antimicrobial properties of the peptide.

These results highlight the significant potential of *H. medicinalis* as a source of new AMPs with diverse activity profiles. The *E. coli* expression system provides a reliable and efficient platform for the high-throughput screening and characterisation of these peptides. The discovery of LBrHM1(1-23) warrants further investigation as a potential therapeutic agent due to its unique sequence, broad-spectrum activity and lack of homology to existing AMPs.

References

1. Grafskaia E.N. et al. Method for Analyzing the Antimicrobial Activity of Peptides via the Escherichia coli Expression System // Appl. Biochem. Microbiol. 2025. Vol. 61 (1). P. 76–83.

2. Cho J.H. et al. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization // Biochimica Biophysica Acta (BBA) —Molecular Basis Disease. 1998. Vol. 1408 (1). P. 67–76.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #23-15-00084).

© M.Y. Serebrennikova, E.N. Grafskaia, K.A. Brovina, V.A. Manuvera, D.D. Kharlampieva, P.A. Bobrovsky, V.N. Lazarev, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-233

INVESTIGATION OF THE RS4680 POLYMORPHISM OF THE COMT GENE IN INDIVIDUALS DEPENDENT ON SYNTHETIC CATHINONES AND CANNABINOIDS

S. E. Sokolova[1], M. A. Gubina[2]

[1] *Specialized Educational Scientific Center, Novosibirsk State University*
[2] *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*

✉ s.sokolova4@school.nsu.ru

Abstract

This study investigates the rs4680 polymorphism of the COMT gene in individuals dependent on synthetic drugs and healthy individuals. Using molecular-genetic methods and statistical analysis, the research identifies differences in AA genotype frequency and specific haplotypes in addicts, suggesting their potential as markers for susceptibility to synthetic drug dependence.

The study's significance stems from the rising use of synthetic drugs and their severe medical and social consequences. Numerous studies indicate that synthetic cannabinoids and cathinones cause more serious negative effects and are more frequently associated with psychosis compared to their natural predecessors [1, 2]. The COMT gene, encoding an enzyme responsible for the metabolism of catecholamines, plays a key role in regulating neurotransmitters, influencing mental disorders and addictions [3].

The aim of this work is to investigate the rs4680 polymorphism of the COMT gene in individuals dependent on synthetic cathinones and cannabinoids compared to healthy individuals, and to analyze haplotypes of DBH genes: 5′-ins/del (rs141116007), IVS5 C195T (rs2519152), G444A (rs1108580) to identify genetic markers of addiction risk [4].

The study employed polymerase chain reaction, restriction analysis, and statistical methods. These methods were used to analyze DNA samples from 165 individuals dependent on synthetic drugs and 150 healthy individuals.

Statistical analysis included Hardy-Weinberg equilibrium testing and chi-square tests to assess differences in genotype and allele frequencies. The Matplotlib library in Python was used to visualize genotype distribution under the Hardy-Weinberg equilibrium. Haplotypes were analyzed to identify specific combinations associated with addiction.

Analysis of the rs4680 COMT gene revealed differences in AA homozygote frequency between dependent and healthy individuals, but no statistically significant differences were found due to limited sample size. Both groups conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium. Among three subgroups of dependents (1. Cathinones, 2. Cannabinoids, 3. Mixed group), the rare AA genotype frequency was higher in the mixed group, while the rare A allele frequency was elevated in the cathinone-dependent group. The highest number of mental disorders was observed in the cathinone-dependent group (13 of 26 cases). Four haplotypes unique to dependent individuals were identified for COMT and DBH genes.

For the first time, frequently occurring combinations of polymorphic loci of the COMT gene (rs4680) (haplotypes) were identified, which may be considered potential markers of risk for developing dependence on synthetic psychoactive substances, contributing to understanding the genetic basis of this condition.

References

1. Deng H. et al. Psychosis and synthetic cannabinoids // Psychiatry Res. 2018. Vol. 268. P. 400–412.

2. Kaeser P. S., Regehr W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release // Annu. Rev. Physiol. 2014. Vol. 76. P. 333–363.

3. Maksimov V. N. et al. Val158Met rs4680 polymorphism of the COMT gene and vital exhaustion in an open population aged 45–64 years // Sib. Sci. Med. J. 2018. Vol. 38, No. 4. P. 58–64.

4. Gubina M. A., Solovyeva I. G., Babenko V. N. et al. Analysis of the frequency of dopamine-β-hydroxylase gene haplotypes in individuals dependent on synthetic drugs // Narkologiya. 2022. Vol. 21, No. 8. P. 20–29.

© S. E. Sokolova, M. A. Gubina, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-234

LIVE TRACKING OF HETEROCHROMATIN REMODELLING IN MESENCHYMAL STEM CELLS DURING ADIPOGENIC AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

T. X. Wu[1], K. Y. Kulebyakin[2], L. V. Putlyaeva[2,3]

[1]*Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University*
[2]*Laboratory of Molecular Endocrinology, Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University*
[3]*Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University*

✉ sianbaovitch@gmail.com

Abstract

Using epigenetic fluorescent sensors, we have shown that heterochromatin remodeling unfolds in opposing directions for adipogenic and osteogenic differentiation. Furthermore, addition of 100 μM indomethacin to adipogenic differentiation did not strongly affect dynamic of heterochromatin remodeling despite inducing rapid formation of lipid droplets.

An MSC ASC52telo cell line expressing an epigenetic sensor was created using lentiviral transfection and FACS. This sensor consists of two MPP8 CHROMO-domains, mTurquoise2 and NLS [1]. The cells were differentiated into adipogenic and osteogenic lineages and heterochromatin patterns of nuclei were registered in live cells. Images of single nuclei were analyzed using 98 image features (Haralick features, TAS features, Zernike moments and chromatin features) to describe epigenetic patterns. These feature values were then averaged and used for clustering by employing PCA for dimensionality reduction and data projection into a 2D graph (fig. 1).

Machine learning analysis of H3K9me3 rearrangement during differentiation detected early changes in heterochromatin organization as early as day 2, which continued to change throughout differentiation. Heterochromatin patterns of adipogenic and osteogenic differentiation diverged at early stages and did not converge at any point in time (fig. 2, *b*). Comparison of adipogenic differentiation with and without addition of 100 μM indomethacin, an allosteric PPAR-γ ac-

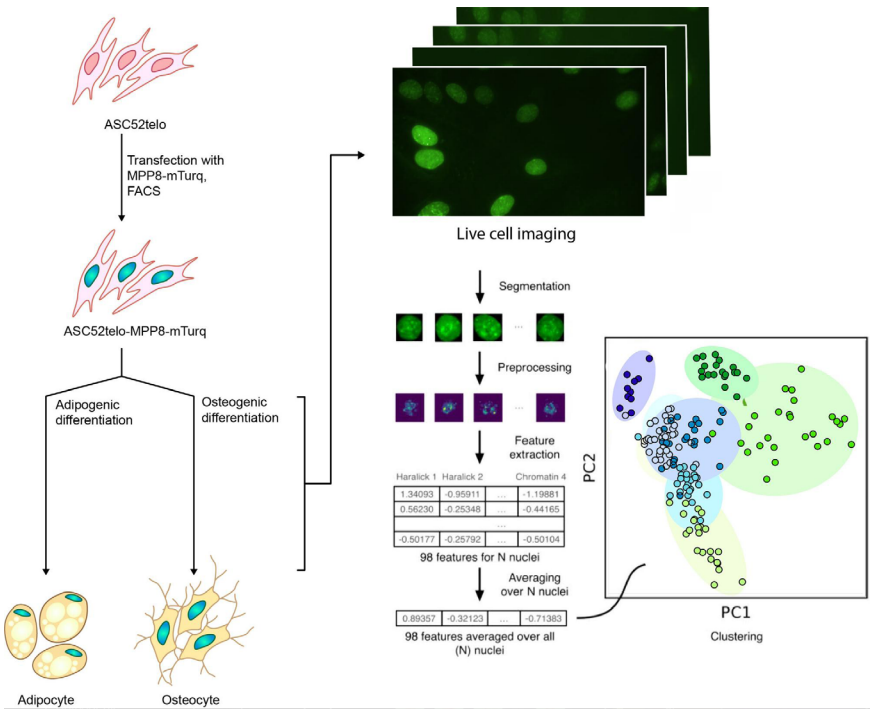


Fig. 1. Analysis of epigenetic remodeling

© T. X. Wu, K. Y. Kulebyakin, L. V. Putlyaeva, 2025

tivator, showed that despite higher lipid droplet formation in samples with indomethacin (fig. 3), the overall dynamics of heterochromatin remodeling remained the same (see fig. 2, *a*).

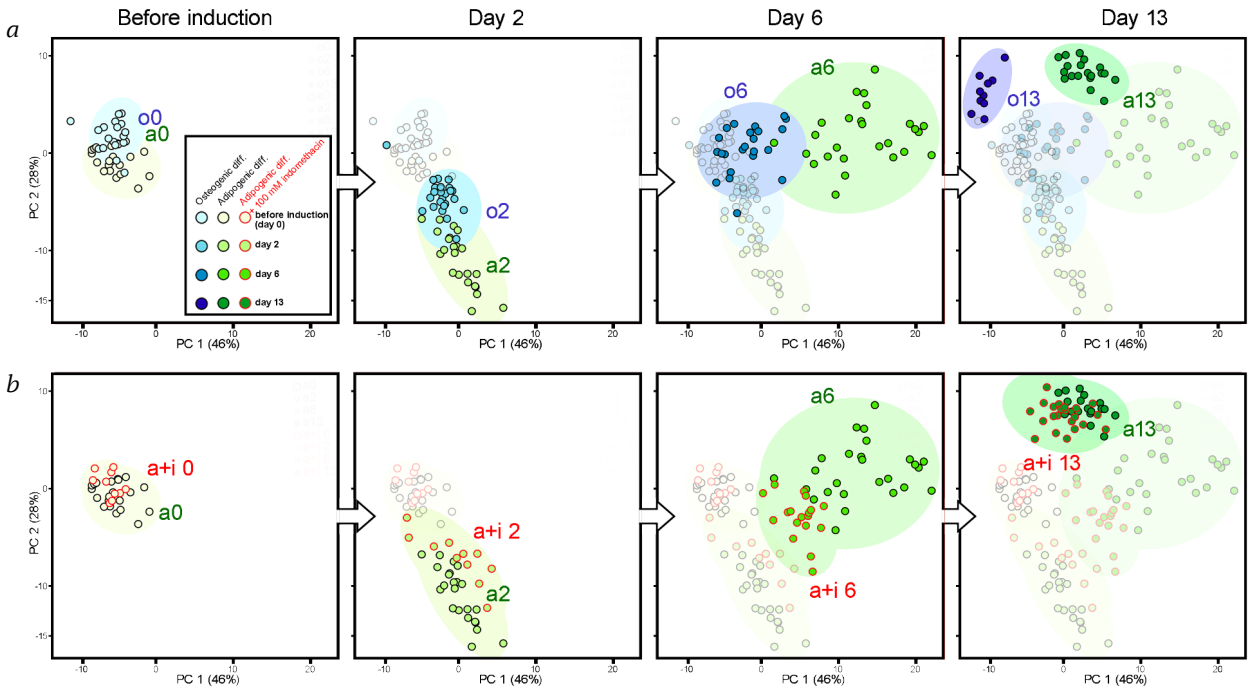


Fig. 2. Principal Component Analysis (PCA) of heterochromatin features throughout differentiation. Comparison of (*a*) adipogenic and osteogenic differentiation and (*b*) adipogenic with and without 100 μM indomethacin

Our research highlights the potential of epigenetic sensors as a sensitive tool for tracking cell processes at single cell level. The next step in our work is to further analyze epigenetic remodeling in other key processes, such as dedifferentiation, aging and oncogenesis [2, 3].

References

1. Stepanov A. I., Shuvaeva A. A., Putlyaeva L. V. et al. Tracking induced pluripotent stem cell differentiation with a fluorescent genetically encoded epigenetic probe // Cell Mol. Life Sci. 2024. Vol. 81 (1).

2. Nicetto D., Zaret K. S. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance // Curr. Opin. Genet. Dev. 2019. Vol. 55. P. 1–10.

3. Wang R., Wang Y., Zhu L. et al. Epigenetic Regulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Differentiation and Osteoporosis // Stem Cells Int. 2020. Vol. 2020 (2). P. 1–17.

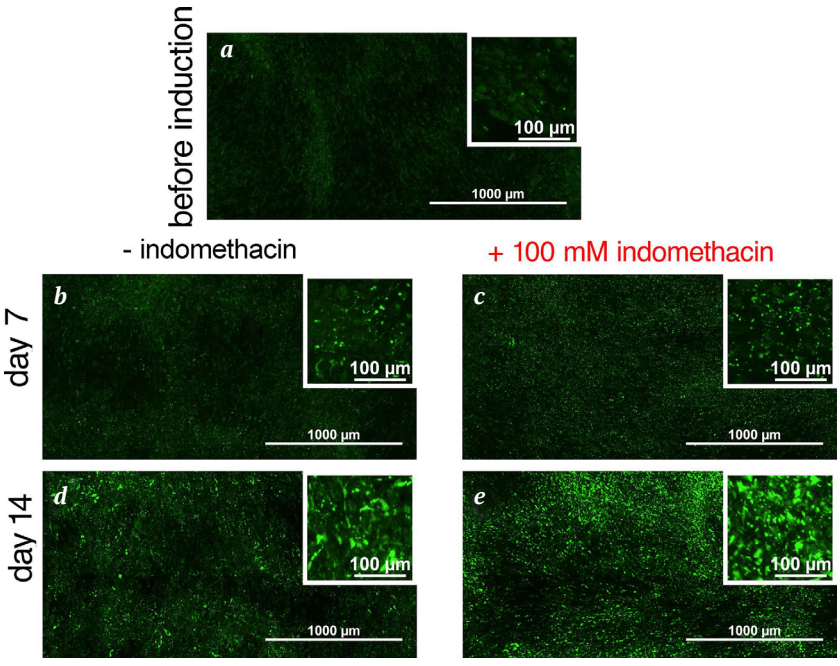


Fig. 3. Nile Red staining of lipid droplets in adipogenic differentiation (*a*) before differentiation induction (*b*, *c*) 7 days and (*d*, *e*) 14 days after induction

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-235

ENGINEERING A SYNTHETIC METABOLIC PATHWAY IN *ESCHERICHIA COLI* FOR CELLULOSE-BASED ISOBUTENE PRODUCTION

S. S. Zaplavnaia[1], I. O. Velegzhaninov[1,2]

[1]*ITMO University, Saint Petersburg*
[2]*Institute of Biology, Komi Science Centre UB RAS, Syktyvkar*

✉ zaplavnayasofiia@gmail.com

Abstract

This project aims to engineer *E. coli* to convert cellulose into isobutene via a synthetic metabolic pathway. By combining cellulase secretion and α-ketoisocaproate dioxygenase expression, the strain could produce isobutene directly from renewable biomass, offering a sustainable alternative to petrochemical synthesis.

The growing global demand for sustainable biofuels has highlighted the urgent need to develop renewable alternatives to fossil-derived hydrocarbons. Among potential candidates, isobutene stands out as a high-value platform chemical used in the production of synthetic high-quality fuel, rubber, plastics, and aviation fuel additives. Traditionally obtained via petrochemical cracking, isobutene can be synthesized biologically, offering a greener production strategy with reduced carbon emissions.

This project focuses on the metabolic engineering of *Escherichia coli* to enable the direct conversion of cellulose into isobutene through a novel synthetic pathway. Since *E. coli* naturally lacks both the capacity to degrade cellulose and the ability to produce isobutene, the strain must be genetically modified at two key levels: (1) extracellular degradation of cellulose into glucose, and (2) conversion of glucose through the leucine biosynthesis pathway into isobutene.

For cellulose degradation, a chimeric gene (*Cel-Tfu*) was designed by fusing the catalytic domain of a cellulase (Cel-CD) from *Bacillus sp.* to the β-1,4-glucosidase gene (*Tfu0937*) from *Thermobifida fusca*). Cel-CD also serves as a secretion carrier, allowing the fused enzyme to be exported outside the cell, where it catalyzes the breakdown of cellulose into glucose [1, 2]. Glucose is then transported into the cell and metabolized via glycolysis to pyruvate, which feeds into the branched-chain amino acid synthesis pathway.

In the second stage, a codon-optimized α-ketoisocaproate dioxygenase (*KICD*) gene from *Rattus norvegicus* is introduced into *E. coli*. KICD catalyzes the conversion of α-ketoisocaproate (KIC), a key intermediate in leucine biosynthesis, into β-hydroxy-β-methylbutyrate (HMB), which spontaneously decomposes into isobutene under physiological conditions [3]. This synthetic route bypasses fermentative pathways and enables non-fermentative, gas-phase production of isobutene, which diffuses out of the bacterial cell.

The project includes the design and construction of recombinant plasmids containing either the *Cel-Tfu* or *KICD* gene, followed by their individual expression in *E. coli*. Each gene product is evaluated separately in terms of transcriptional and translational efficiency, as well as enzymatic activity. Once both constructs are characterized, the genes are co-expressed from a single plasmid to evaluate the functionality of the full synthetic pathway from cellulose to isobutene. The experimental strategy is built around iterative design, expression analysis, and pathway optimization.

The next stages of the project involve optimizing expression conditions, evaluating the volume of isobutene produced, and assessing whether the production level is sufficient for potential industrial applications. Additionally, to improve the yeild of isobutene, overexpression of *leuABCD* operon is suggested focusing on 2-isopropylmalate synthase (*leuA*) modifications as it's expression is down-regulated by KIC concentrations [4].

This research contributes to the development of a sustainable microbial platform for bio-based isobutene production from lignocellulosic feedstocks, paving the way for environmentally friendly alternatives to fossil fuel-based chemical synthesis.

References

1. Gao D., Luan Y., Wang Q. et al. Construction of cellulose-utilizing Escherichia coli based on a secretable cellulase // Microb. Cell Factories. 2015. Vol. 14, No. 159.

2. Gao D et. al. Identification of a Heterologous Cellulase and Its N-Terminus That Can Guide Recombinant Proteins Out of Escherichia coli // Microb. Cell Factories. 2015. Vol. 14, No. 49.

3. Mustila H. et. al. Isobutene Production in Synechocystis sp. PCC 6803 by Introducing α-Ketoisocaproate Dioxygenase from Rattus norvegicus // Metab. Eng. Commun. 2021. Vol. 12. P. e00163.

4. Hao Y., Pan X., Li G. et al. Construction of a plasmid-free L-leucine overproducing Escherichia coli strain through reprogramming of the metabolic flux // Biotechnol. Biofuels Bioproducts. 2023. Vol. 16, No. 145.

© S. S. Zaplavnaia, I. O. Velegzhaninov, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-236

СИСТЕМА ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ MMCAS12M И НОВЫХ ВАРИАНТОВ РЕДАКТОРОВ ОСНОВАНИЙ *

A SYSTEM FOR GENOMIC EDITING BASED ON MMCAS12M AND NEW VARIANTS OF BASE EDITORS

Т. И. Алиев[1,2], А. Р. Иматдинов[2], Е. Ю. Прудникова[2], И. Р. Иматдинов[2]

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

T. I. Aliev[1,2], A. R. Imatdinov[2], E. Yu. Prudnikova[2], I. R. Imatdinov[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ aliev.timur99@yandex.ru

Аннотация

Создана система быстрого скрининга эффективных sgRNA для MmCas12m при таргетировании на область старт-кодона гена *gag* ВИЧ-1. Система скрининга применена для *in vitro* тестирования эффективности 9 уникальных sgRNA. На линии клеток TZM-bl показана функциональность системы геномного редактирования, состоящей из MmCas12m, sgRNA и нового варианта двойного редактора оснований.

Abstract

A system of rapid screening of effective single guide RNA for MmCas12m has been created for targeting the start codon region of the HIV-1 *gag* gene. The screening system was used for *in vitro* testing of the effectiveness of 9 unique single guide RNAs. The functionality of a genomic editing system consisting of MmCas12m, a single guide RNA, and a new variant of a dual base editor is shown on the TZM-bl cell line genome editing.

С созданием инструментов генного редактирования, таких как нуклеазы типа «цинковые пальцы» (ZFN), TALEN и CRISPR-Cas-системы, начались работы по точечному редактированию генома. Общий принцип работы этих инструментов — внесение двухцепочечных разрывов в ДНК с дальнейшей репарацией по механизму негомологичного соединения концов или по нативной/экзогенной матрице. Однако нуклеазная активность повышает генотоксичность.

Альтернативой выступили рекомбинантные редакторы оснований ДНК. Они способны к редактированию азотистых оснований по механизму дезаминирования. При этом в последовательность ДНК не вносятся двухцепочечные разрывы. В последние годы получены новые варианты редакторов оснований. Так, на основе редактора оснований аденина TadA-8e получен вариант, способный к дезаминированию аденина и цитозина [1].

Редакторы оснований не способны связываться с участком редактирования, эту функцию выполняют CRISPR-Cas-системы. Внимание привлекает недавно открытый MmCas12m, полученный из *Mycolicibacterium mucogenicum*. Особенностью MmCas12m является сверхкомпактность (596 аминокислот) и высокая способность связывания с ДНК [2, 3].

В рамках работы применена система из двойного редактора оснований на основе варианта MmCas12m для редактирования старт-кодона гена *gag* ВИЧ-1. Ген *gag* был выбран как перспективная мишень для генной терапии ВИЧ-инфекции. Данный ген кодирует протеин Gag, состоящий из доменов MA, CA, NC, p6. Во время созревания эти домены гидролизуются вирусной протеазой, образуя основу вириона. Ген *gag* является моделью для начального тестирования работоспособности системы. В дальнейшем планируется нацеливание на относительно консервативные участки других генов ВИЧ-1, например *tat* и *rev,* для их инактивации.

Проведен дизайн и *de novo* синтез химерного гена *NLS-MmCas12m-NLS-TadA8e* — MmCas12m, слитого с двойным редактором оснований TadA-8e и сигналами ядерной локализации. Проведен дизайн и синтез последовательностей, кодирующих 9 уникальных sgRNA, нацеливающих MmCas12m на область старт-кодона гена *gag*. Для отбора эффективных sgRNA возникла необходимость в создании системы быстрого скрининга. В ее основе лежит трансляция гена-репортера, зависимая от состояния старт-кодона экзогенной последовательности ДНК, на которую предполагается таргетирование. В этом случае перед геном флуоресцентного белка

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, соглашение № 075-15-2025-526).

© Т. И. Алиев, А. Р. Иматдинов, Е. Ю. Прудникова, И. Р. Иматдинов, 2025

клонирован участок 5′-LTR ВИЧ-1, включающий сигнал упаковки PSI и фрагмент нуклеотидной последовательности первых 14 аминокислот белка Gag. Находясь в одной рамке считывания, фрагмент генома ВИЧ-1 приводит к росту доли GFP-позитивных клеток и изменению локализации сигнала на плазматическую мембрану клетки по сравнению с плазмидой без фрагмента генома ВИЧ-1. При клонировании фрагмента генома ВИЧ-1 со сдвигом рамки считывания гена-репортера происходит снижение доли GFP-позитивных клеток. Элиминация старт-кодона фрагмента генома ВИЧ-1 приводит к восстановлению исходного фенотипа по локализации сигнала в обоих случаях, что подтверждено методом микроскопирования. Методом проточной цитометрии подтверждено восстановление доли GFP-позитивных клеток до исходных значений. Таким образом, наблюдается удобная для быстрого скрининга экспрессия гена-репортера, зависимая от инициации трансляции с экзогенной последовательности.

Применена одна из плазмид (pKW_R1) данной системы для анализа эффективности связывания MmCas12m с областью старт-кодона гена *gag* ВИЧ-1 в зависимости от sgRNA. С использованием лентивирусных частиц получены 9 трансгенных линий HEK293T, стабильно экспрессирующих MmCas12m с одной sgRNA. Проведена трансфекция каждой трансгенной линии плазмидой pKW_R1, содержащей ген-репортер GFP с фрагментом генома ВИЧ-1 в единой рамке считывания. В случае связывания с последовательностью генома ВИЧ-1 MmCas12m должен блокировать транскрипцию. Методом проточной цитометрии установлено, что 4 из 9 sgRNA обеспечивают статистически значимую эффективность в снижении доли GFP-позитивных клеток.

Последовательность каждой sgRNA клонирована в акцепторную плазмиду с геном *NLS-MmCas12m-NLS-TadA8e* для синтеза комплекса редактирования. Проведена трансфекция клеток линии TZM-bl данными плазмидами. Особенностью линии TZM-bl является наличие в геноме фрагмента 5′-LTR провирусной ДНК ВИЧ-1, искомой для редактирования. Функциональность системы редактирования подтверждена методом гидролиза Т7 эндонуклеазы I для выявления мисс-матч мутаций. В дальнейших работах будет задействован метод секвенирования нового поколения для количественной оценки эффективности редактирования.

Литература

1. Neugebauer M. E., Hsu A., Arbab M. et al. Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity // Nat Biotechnol. 2023. Vol. 41. P. 673–685.

2. Bigelyte G., Duchovska B., Zedaveinyte R. et al. Innate programmable DNA binding by CRISPR-Cas12m effectors enable efficient base editing // Nucleic Acids Res. 2024. Vol. 52. P. 3234–3248.

3. Wu W. Y., Mohanraju P., Liao C. et al. The miniature CRISPR-Cas12m effector binds DNA to block transcription // Mol. Cell. 2022. Vol. 82. P. 4487–4502.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-237

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ TCR-T-КЛЕТОК ПРОТИВ HER2/NEU: ТРАНСКРИПТОМИКА, СЕКРЕТОМИКА И ПОДАВЛЕНИЕ ОПУХОЛИ *IN VIVO*

MOLECULAR MECHANISMS OF ANTI-HER2/NEU TCR-T CELLS: TRANSCRIPTOMICS, SECRETOMICS, AND *IN VIVO* TUMOR SUPPRESSION

С. Алрхмун[1–3], Р. Ю. Перик-Заводский[1,2], М. С. Фишер[1,2], Ю. А. Лопатникова[1,2], О. Ю. Перик-Заводская[1], Ю. А. Шевченко[1,2], К. В. Назаров[1], Ю. Г. Филиппова[1,2], В. В. Курилин[1], Е. А. Голикова[2], П. С. Тимашев[2], П. В. Глыбочко[2], С. В. Сенников[1,2]

[1]*НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск*
[2]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*
[3]*Новосибирский государственный университет*

S. Alrhmoun[1–3], R. Y. Perik-Zavodskii[1,2], M. S. Fisher[1,2], J. A. Lopatnikova[1,2], O. Y. Perik-Zavodskaia[1], J. A. Shevchenko[1,2], K. V. Nazarov[1], J. G. Philippova[1,2], V. V. Kurilin[1], E. A. Golikova[2], P. S. Timashev[2], P. V. Glybochko[2], S. V. Sennikov[1,2]

[1]*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*
[2]*Sechenov First Moscow State Medical University*
[3]*Novosibirsk State University*

✉ saleh.alrhmoun1@gmail.com

Аннотация

TCR-T-клеточная терапия открывает новые горизонты в иммунотерапии рака, позволяя Т-клеткам точно распознавать антигены опухолей через молекулы HLA. HER2/neu антиген, переэкспрессируемый при раке молочной железы, желудка и других опухолях, служит ключевой мишенью. На основе исследований лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ мы исследуем TCR-клонотип к пептиду KIFGSLAFL (HLA-A*02) HER2/neu, оценивая его эффективность и безопасность *in vitro* и *in vivo*.

Abstract

TCR-T cell therapy is revolutionizing cancer immunotherapy, empowering T-cells to precisely target tumor antigens via HLA molecules. HER2/neu antigen is a prime target, overexpressed in breast, gastric, and other types of cancers. Building on the Molecular Immunology Lab at RIFCI's TCR repertoire, we investigate a TCR clonotype specific to the KIFGSLAFL peptide (HLA-A*02) of the HER2/neu antigen, assessing its therapeutic efficacy and safety *in vitro* and *in vivo*.

Методы

Для изучения эффективности TCR-T-клеток применялся комплексный подход.

• *In vitro* цитотоксические анализы для оценки способности TCR-T-клеток уничтожать опухолевые клетки с высокой экспрессией HER2/neu.

• Секвенирование RNA единичных клеток на платформе BD Rhapsody для анализа транскриптома TCR-T-клеток после сокультивирования с опухолевыми клетками.

• Профилирование секретома с использованием LegendPlex для измерения секретируемых цитокинов и эффекторных молекул после сокультивирования с опухолевыми клетками.

• *In vivo* модели ксенотрансплантатов HER2/neu-экспрессирующих опухолей на мышах для оценки противоопухолевой активности TCR-T-клеток.

Результаты

TCR-T-клетки, специфичные к HER2/neu, показали высокую антиген-специфическую цитотоксичность *in vitro*, преимущественно поражая опухолевые клетки с повышенной экспрессией HER2/neu. Секвенирование RNA единичных клеток выявило уникальную популяцию двойных положительных (CD4+CD8+) Т-клеток, возникающих при взаимодействии с антигеном. Эта популяция характеризуется цитотоксическим транскриптомом с повышенной экспрессией генов гранзима B, гранулизина, перфорина и TNF-α. Профилирование секретома подтвердило значительное увеличение продукции эффекторных молекул, включая IL-2, гранзим B,

© С. Алрхмун, Р. Ю. Перик-Заводский, М. С. Фишер, Ю. А. Лопатникова, О. Ю. Перик-Заводская, Ю. А. Шевченко, К. В. Назаров, Ю. Г. Филиппова, В. В. Курилин, Е. А. Голикова, П. С. Тимашев, П. В. Глыбочко, С. В. Сенников, 2025

TNF-α и IFN-γ, что указывает на мощную активацию TCR-T-клеток. В экспериментах *in vivo* TCR-T-клетки обеспечили устойчивое подавление роста опухоли в моделях ксенотрансплантатов, демонстрируя высокий терапевтический потенциал.

Обсуждение

Полученные данные подтверждают широкую применимость ранее идентифицированного репертуара TCR, специфичных к HER2/neu [1], и раскрывают молекулярные механизмы их терапевтической эффективности. TCR-T-клетки демонстрируют мощную цитотоксическую активность против опухолей с повышенной экспрессией HER2/neu, которая в 100–200 раз выше, чем в нормальных клетках, обеспечивая терапевтическое окно. Появление популяции двойных положительных CD4+CD8+ T-клеток, ранее ассоциированной с усиленными эффекторными функциями в иммунотерапии [2], может обеспечивать преимущества в TCR-T-терапии за счет сочетания хелперных функций CD4+ T-клеток с цитотоксическими способностями CD8+ T-клеток, что способствует превосходной противоопухолевой активности. Анализ секретома выявил повышенную продукцию IL-2, гранзима B, TNF-α и IFN-γ, подчеркивая активацию T-клеток и их способность модулировать опухолевое микроокружение. *In vivo* TCR-T-клетки обеспечили устойчивое подавление опухолей в моделях ксенотрансплантатов, подтверждая их терапевтический потенциал. Эти данные создают основу для продвижения TCR-терапий к клиническому применению при HER2/neu-положительных раках, хотя необходимы исследования для оптимизации устойчивости T-клеток в опухолевой микросреде.

Литература

1. Alrhmoun S., Fisher M., Lopatnikova J. et al. Targeting precision in cancer immunotherapy: Naturally-occurring antigen-specific TCR discovery with single-cell sequencing // Cancers. 2024. Vol. 16, No. 23. URL: https://doi.org/10.3390/cancers16234020 (accessed: 01.08.2025).

2. Nascimbeni M., Shin E.-C., Chiriboga L. et al. Peripheral CD4+CD8+ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions // Blood. 2004. Vol. 104, No. 2. P. 478–486. URL: https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4395 (accessed: 01.08.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-238

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА КОИЛИН-СОДЕРЖАЩИХ ЯДЕРНЫХ ТЕЛЕЦ В КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТКАХ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МЫШИ

DYNAMICS OF COILIN-CONTAINING NUCLEAR BODIES IN CUMULUS CELLS OF OVARIAN PRE-OVULATORY FOLLICLES IN AGING MICE

А. С. Анисимов[1], И. О. Боголюбова[2]

[1]*Санкт-Петербургский государственный университет*
[2]*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

A. S. Anisimov[1], I. O. Bogolyubova[2]

[1]*Saint Petersburg State University*
[2]*Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg*

✉ alexey.nisimov@gmail.com

Аннотация

3D-анализ коилин-содержащих ядерных телец в кумулюсных клетках мышей разных возрастных групп, проведенный в ImageJ, выявил значимые ($p < 0{,}01$) возрастные изменения: снижение медианного числа телец на ядро (с 6 до 4,5) и повышение интенсивности флуоресценции. Результаты свидетельствуют о выраженной перестройке ядер кумулюсных клеток при старении яичников.

Abstract

Using a custom ImageJ macro for 3D quantification of coilin-containing bodies in mouse cumulus cells across three age groups, we identified significant ($p < 0.01$) age-related changes: a decrease in the median number of bodies per nucleus (from 6 to 4.5) and an increase in fluorescence intensity, suggesting altered nuclear organization in cumulus cells during ovarian aging.

Кумулюсные клетки (специализированная популяция гранулезных клеток, окружающих ооцит) играют ключевую роль в оогенезе и фолликулогенезе, обеспечивая питание и регуляцию развития ооцита [1].

Целью настоящего исследования являлось изучение возрастной динамики коилин-содержащих телец в кумулюсных клетках мыши. Эти тельца представляют собой гетерогенную популяцию безмембранных ядерных органелл, вовлеченных в такие важные функции, как процессинг малых ядерных РНК и поддержание длины теломер [2, 3].

Для исследования использовали кумулюсные клетки, полученные от трех мышей каждой возрастной группы: молодых (2–3 мес.), взрослых (6–7 мес.) и старых (12 мес.). Все животные перед забором материала подвергались гормональной стимуляции препаратом «Фоллигон» для синхронизации эстрального цикла и увеличения числа преовуляторных фолликулов. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием первичных поликлональных антител против коилина и вторичных козьих антител против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с Alexa 488. Препараты заключали в среду Vectashield с добавлением DAPI и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica SP5.

Анализ полученных изображений выполняли с помощью специально разработанного автоматизированного алгоритма в программе ImageJ, который включал три основных модуля: идентификацию отдельных ядер в стеке изображений, сегментацию ядерных структур и экспорт количественных параметров для статистического анализа. Для обеспечения высокой точности измерений алгоритм включал 3D-гауссовское размытие для подавления шума и специальные параметры детекции локальных максимумов.

Всего было проанализировано 129 ядер, соответствующих строгим критериям качества. Выявляемые с помощью иммунофлуоресцентного мечения коилин-положительные тельца представлены в ядрах клеток кумулюса как более крупными структурами (рис. 1, *стрелки*), так и мелкими точечными зонами с меньшей интенсивностью флуоресцентного мечения (см. рис. 1, *головки стрелок*).

Результаты исследования выявили четкую возрастную динамику параметров коилин-положительных телец. В группе молодых животных медианное количество телец на ядро составляло 6, тогда как в группе старых животных этот показатель снижался до 4,5 ($p = 0{,}0007$ по критерию Джонкира). При этом максимальное количество телец в отдельных ядрах молодых животных достигало 33, что значительно превышало аналогичные показатели у взрослых (13 телец) и старых (7 телец) особей (рис. 2, *а*).

© А. С. Анисимов, И. О. Боголюбова, 2025

Примечательно, что, наряду с динамикой количества коилин-положительных телец, интенсивность свечения демонстрирует положительную возрастную динамику (см. рис. 2, *б*). При этом, как и для количества телец, не выявлено статистически значимых различий в интенсивности свечения между молодыми и взрослыми животными — значимое увеличение интенсивности наблюдается только у старых животных (12 месяцев) по сравнению с молодыми и взрослыми животными.

Таким образом, разработанный метод автоматизированного анализа трехмерных изображений показал высокую эффективность для количественной оценки тонких изменений в организации ядерных структур. Получен-

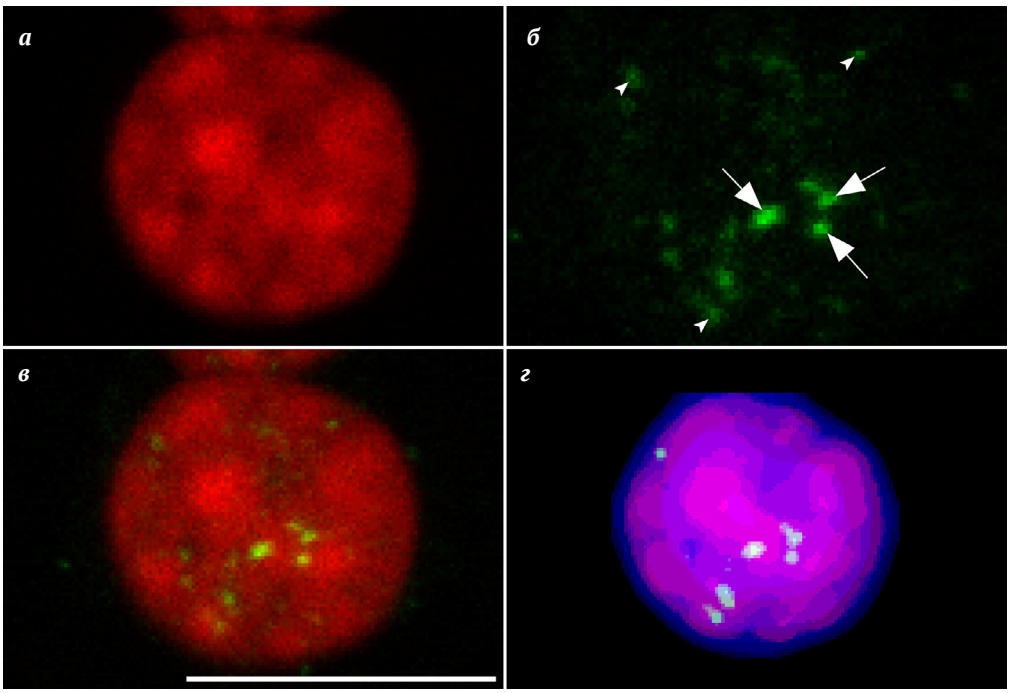


Рис. 1. Типичная картина распределения хроматина и коилин-позитивных телец в ядре кумулюсной клетки: *а* — DAPI, *б* — коилин, *в* — совмещение, *г* — сегментированные алгоритмом объекты ядра для морфометрического анализа. Масштабный отрезок — 10 мкм

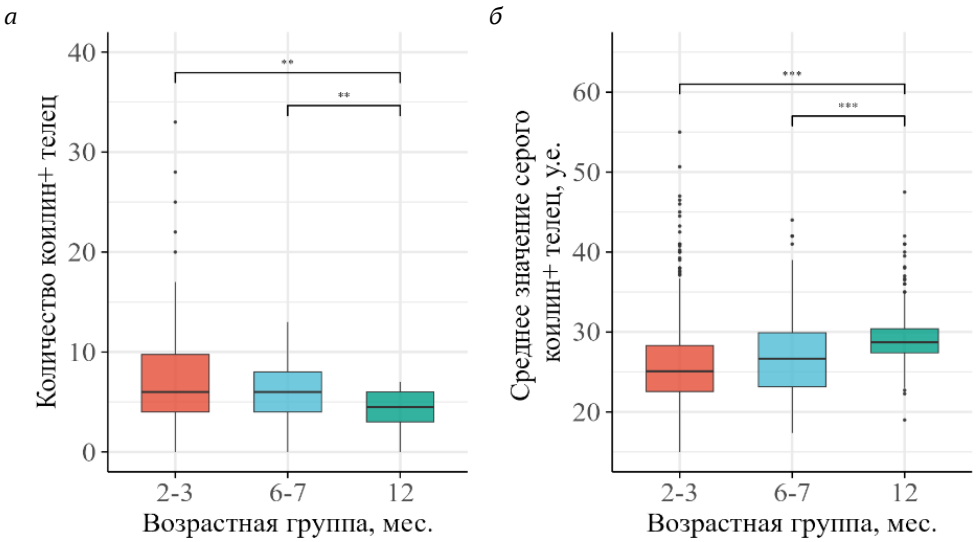


Рис. 2. Количество (*а*) и интенсивность флуоресценции (*б*) коилин-позитивных телец (n = 812) в ядрах кумулюсных клеток (n = 129), полученных от самок разного возраста.
** — различия между группами достоверны для $p < 0{,}01$;
*** — различия между группами достоверны для $p < 0{,}001$

ные данные свидетельствуют о значительных возрастных изменениях в организации ядерных структур кумулюсных клеток. Уменьшение количества коилин-положительных телец при одновременном увеличении их размеров и интенсивности флуоресценции может отражать изменения функциональной активности ядер кумулюсных клеток, связанные со старением яичников.

Литература

1. Russel D. L., Robker R. L. Cumulus Cells // Encyclopedia Reprod. (Second Ed.). Academic Press, 2018. P. 43–46.

2. Morris G. E. The Cajal Body // Biochimica Biophysica Acta. 2008. Vol. 1783, No. 11. P. 2108–2115.

3. Stanek D., Neugebauer K. M. The Cajal Body: A Meeting Place for Spliceosomal snRNPs in the Nuclear Maze // Chromosoma. 2006. Vol. 115, No. 5. P. 343–354.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-239

МЕХАНИЗМЫ ЦИНК-ЗАВИСИМОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕТЧАТКИ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ *

MECHANISMS OF ZINC-DEPENDENT RETINAL DAMAGE IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Т. А. Асаевич[1], Н. Г. Шебардина[2,5], Н. Н. Новикова[3], М. П. Шевелёва[4], О. Е. Ильюхин[5], Е. А. Корчуганова[5], Е. Н. Иомдина[6], О. Г. Оганесян[6], М. Л. Шишкин[1,2], С. С. Тулуш[1,2], С. А. Белолипская[1], Е. Ю. Зерний[2]

[1]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*
[2]*НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3]*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*
[4]*Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино*
[5]*НМИЦ эндокринологии им. акад. И. И. Дедова Минздрава России, Москва*
[6]*Национальный медицинский исследовательский центр болезней глаза им. Гельмгольца Минздрава России, Москва*

T. A. Asaevich[1], N. G. Shebardina[2,5], N. N. Novikova[3], M. P. Shevelyova[4], O. E. Ilyukhin[5], E. A. Korchuganova[5], E. N. Iomdina[6], O. G. Oganesyan[6], M. L. Shishkin[1,2], S. S. Tulush[1,2], S. A. Belolipskaya[1], E. Yu. Zernii[2]

[1]*Sechenov First Moscow State Medical University*
[2]*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University*
[3]*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*
[4]*Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino*
[5]*Dedov National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow*
[6]*Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow*

✉ timurasaevich@mail.ru

Аннотация

Ключевым триггером повреждения сетчатки при возрастной макулярной дегенерации является окислительный стресс. С использованием образцов пациентов, а также клеточных моделей показано, что нейротоксические эффекты могут опосредоваться за счет действия внеклеточного мобильного цинка, который высвобождается в условиях стресса и связывается с рядом сигнальных факторов, блокируя их активность. Предложены механизмы цинк-зависимой дегенерации сетчатки.

Abstract

Oxidative stress is a key trigger of retinal damage associated with age-related macular degeneration (AMD). Using samples collected from AMD patients as well as cellular models, we show that neurotoxic effects may be mediated by extracellular mobile zinc, which is released under stress conditions and binds to a set of signaling factors, blocking their activity. Mechanisms of zinc-dependent retinal degeneration are proposed.

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одной из наиболее распространенных офтальмопатологий, связанных с хронической прогрессирующей дегенерацией сетчатки. ВМД подвержены более 6 % всего населения старше 40 лет, причем в 0,8 % случаев регистрируются поздние стадии заболевания, приводящие к частичной или полной слепоте [1]. В ближайшее время прогнозируется значительный рост частоты встречаемости ВМД по всему миру, в том числе в странах Европы [2]. Необходимым условием для поиска путей профилактики и лечения ВМД является изучение молекулярных основ развития нейродегенерации сетчатки при этом заболевании. Растущее число данных указывает на взаимосвязь между нейродегенерацией сетчатки и окислительным стрессом, связанным с фотоокислением липофусцина в клетках пигментного эпителия сетчатки. Недавно было показано, что непосредственным медиатором нейродегенеративных процессов при патологиях сетчатки могут быть мобильные формы цинка, секретируемые во внеклеточную среду в условиях окислительного стресса [3, 4], однако белковые мишени патологического действия цинка остаются неизвестными. Целью настоящей работы

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-15-00171).

© Т. А. Асаевич, Н. Г. Шебардина, Н. Н. Новикова, М. П. Шевелёва, О. Е. Ильюхин, Е. А. Корчуганова, Е. Н. Иомдина, О. Г. Оганесян, М. Л. Шишкин, С. С. Тулуш, С. А. Белолипская, Е. Ю. Зерний, 2025

являлось изучение изменений гомеостаза цинка при ВМД, а также поиск механизмов цинк-зависимой нейродегенерации сетчатки при этом заболевании.

Методами рентгенофлуоресцентного анализа с полным внешним отражением и атомно-абсорбционной спектрометрии установлено, что для пациентов с ВМД характерно более чем двукратное увеличение содержания внеклеточного цинка, и аналогичный тренд зафиксирован в клетках пигментного эпителия (линия ARPE-19) в условиях окислительного стресса. Высказано предположение, что мишенями мобильного цинка могут быть сигнальные факторы сетчатки, выполняющие нейротропную и ангиогенную/ангиостатическую функции [5]. С использованием структурных классификаторов, основанных на алгоритмах машинного обучения, среди белков этого типа отобраны кандидаты, которые могут обладать цинк-связывающими свойствами. Методами дифференциальной сканирующей флуориметрии и динамического рассеяния света проанализирована способность отобранных факторов координировать цинк и охарактеризовано влияние цинка на их четвертичную структуру. В результате определен набор цинк-чувствительных факторов, которые склонны к олигомеризации в присутствии этого металла, что предположительно подавляет их нейропротекторную активность и, как следствие, обуславливает цитотоксические эффекты в условиях окислительного стресса. В подтверждение этого предположения с использованием методов оценки метаболической активности клеток и цитометрического анализа показано, что цинк блокирует способность отобранных факторов ингибировать апоптоз клеток ARPE-19 в условиях стресса. Таким образом, аберрантная активность внеклеточных сигнальных факторов в комплексе с цинком может лежать в основе нейродегенерации сетчатки при ВМД, а таргетирование этих комплексов — рассматриваться в качестве потенциальной терапии заболевания.

Литература

1. Friedman D. S. et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States // Arch Ophthalmol. 2004. Vol. 122, No. 4. P. 564–572.

2. Wong W. L. et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis // Lancet Global Health. 2014. Vol. 2, No. 2. P. e106–e116.

3. Chistyakov D. V. et al. A role of pigment epithelium-derived factor in zinc-mediated mechanism of neurodegeneration in glaucoma // Commun. Biol. 2025. Vol. 8, No. 1. P. 965.

4. Li Y. et al. Mobile zinc increases rapidly in the retina after optic nerve injury and regulates ganglion cell survival and optic nerve regeneration // Proceed. Nat. Acad. Sci. 2017. Vol. 114, No. 2. P. E209–E218.

5. King G. L., Suzuma K. Pigment-epithelium–derived factor — a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions // New England J. Med. 2000. Vol. 342, No. 5. P. 349–351.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-240

ИЗОТЕРМИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ЭНТЕРОВИРУСОВ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМА

ISOTHERMAL METHOD FOR DETECTING ENTEROVIRUS RNA BASED ON DETECTION

Ш. Бегюм, М. Капитонова, В. Дедков, А. Долгова

Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Ş. Begüm, M. Kapitonova, V. Dedkov, A. Dolgova

Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg

✉ begum.sas99@gmail.com

Аннотация

В работе представлен способ детекции консервативного участка РНК энтеровируса на основе бинарного дезоксирибозима 10–23, активирующего каталитическое расщепление флуоресцентного субстрата при гибридизации с целевой РНК. Анализ — изотермический, 20 мин, лимит — 0,5 нМ. Сенсор показал высокую специфичность и воспроизводимость при работе с синтетической, транскрибированной и NASBA-амплифицированной РНК.

Abstract

This study describes a method for detecting a conserved region of enterovirus RNA using a binary 10–23 deoxyribozyme that catalyzes the cleavage of a fluorescent substrate upon hybridization with the target RNA. The assay is isothermal (20 min) with a detection limit of 0.5 nM, and the sensor demonstrated high specificity and reproducibility with synthetic, transcribed, and NASBA-amplified RNA.

Введение

Энтеровирусы — РНК-содержащие вирусы, обладающие высокой устойчивостью в окружающей среде. Их передача осуществляется фекально-оральным путем, преимущественно через воду и пищу, что обусловливает широкий спектр вызываемых заболеваний [1, 2]. Стандартные ПЦР-тесты требуют дорогостоящих амплификаторов и ферментных смесей, в то время как дезоксирибозимы 10–23 являются фермент-независимыми катализаторами, способными обеспечить высокоспецифичное выявление РНК-мишеней в изотермических условиях [3, 4].

Цель работы — разработка сенсора на основе дезоксирибозима для специфического обнаружения энтеровирусной РНК в изотермических условиях.

Материалы и методы

Все олигонуклеотиды синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва, Россия). Реактивы KCl, $CaCl_2$ и Tris-HCl приобретены у PanReach Applichem (США). РНК была транскрибирована при помощи T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega, США).

Реакции проводились при 41 °C. Были оптимизированы состав реакционного буфера и концентрации Ca^{2+} (5–100 мМ). Система протестирована с использованием кДНК, полученной из клинических изолятов и амплифицированной методом NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification).

Основные результаты

Схематически механизм работы разработанного биосенсора представлен на рис. 1. Дезоксирибозим 10–23 разделен на 2 части: Dz1 и Dz2, которые при связывании с целевой РНК формируют каталитическое ядро, способное расщеплять флуорогенный субстрат. Такая система обеспечивает минимальный фоновый сигнал и возрастание оптического сигнала в присутствии мишени.

Выбран оптимальный буфер: 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 50 мМ HEPES, 0,06 % Triton X-100, 0,05 % DMSO, с pH 7,4. Оптимальная концентрация кофактора Ca^{2+} 50 мМ.

Система сенсора протестирована на различных концентрациях синтетической РНК (рис. 2, *а*) и транскрибированной РНК (см. рис. 2, *б*). Наблюдается четкая зависимость величины флуоресцентного сигнала от концентрации РНК. Лимит детекции определен как 0,5 нМ. Использование транскрибированной РНК подтвердило высокую чувствительность и работоспособность сенсора, даже при наличии вторичной структуры мишени.

© Ш. Бегюм, М. Капитонова, В. Дедков, А. Долгова, 2025

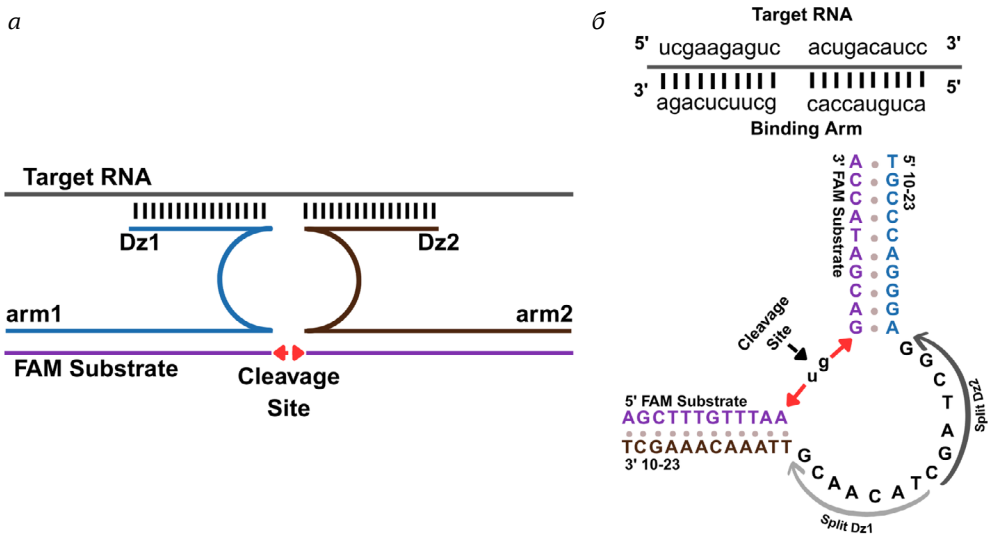


Рис. 1. Схематическое изображение структуры бинарного биосенсора на основе дезоксирибозима (*а*) Молекулярная репрезентация расщепления FAM-субстрата (*б*)

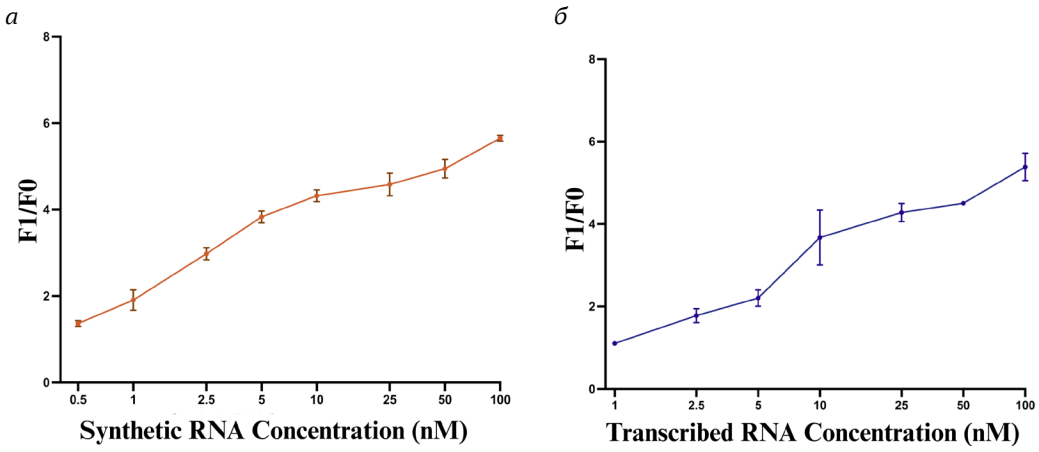


Рис. 2. Значение соотношения флуоресцентного сигнала к фоновому F1/F0 в зависимости от концентрации добавленной синтетической (*а*) и транскрибированной (*б*) РНК

Специфичность системы проверена на синтетических фрагментах РНК шести вирусов (гепатит А, астровирус, норовирус, саповирус, аденовирус, ротавирус). Флуоресценция возрастала только при наличии энтеровирусной РНК, без перекрестной реакции с другими вирусами.

Система проверена на кДНК, полученной от пяти энтеровирусов (вирус Коксаки B4, B5, эховирусы серотипов 3, 11, 13), выделенных из сточных вод и клинических материалов. Нуклеиновые кислоты были амплифицированы изотермически при помощи модифицированного протокола NASBA.

Литература

1. Upfold N. S., Luke G. A., Knox C. Occurrence of human enteric viruses in water sources and shellfish: a focus on Africa // Food Environ. Virol. 2021. Vol. 13 (1). P. 1–31.

2. Lanrewaju A. A., Enitan-Folami A. M., Sabiu S. et al. Global public health implications of human exposure to viral contaminated water // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13. P. 981896.

3. Pilevar M., Kim K. T., Lee W. H. Recent advances in biosensors for detecting viruses in water and wastewater // J. Hazard. Mater. 2021. Vol. 410. P. 124656.

4. Song X., Fredj Z., Zheng Y. et al. Biosensors for waterborne virus detection: challenges and strategies // J. Pharm. Anal. 2023. Vol. 13 (11). P. 1252–1268.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-241

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ СТРАТЕГИЯ ТЕРАПИИ GBA1-АССОЦИИРОВАННОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА: МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ ЧЕРЕЗ ПУТЬ MTOR *

AN ALTERNATIVE THERAPY STRATEGY FOR GBA1-ASSOCIATED PARKINSON'S DISEASE: MODULATION OF GLUCOCEREBROSIDASE FUNCTION VIA THE MTOR PATHWAY

А. И. Безрукова[1,2], К. С. Башарова[1,2], Е. В. Григорьева[3], С. В. Павлова[3], Г. В. Байдакова[4], Е. Ю. Захарова[4], С. Н. Пчелина[1,2], Т. С. Усенко[1,2]

[1]*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина*
[2]*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова*
[3]*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[4]*Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва*

A. I. Bezrukova[1,2], K. S. Basharova[1,2], E. V. Grigor'eva[3], S. V. Pavlova[3], G. V. Baydakova[3], E. Yu. Zaharova[3], S. N. Pchelina[1,2], T. S. Usenko[3]

[1]*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov, National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina*
[2]*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*
[3]*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*
[4]*N. P. Bochkov Research Center for Medical Genetics, Moscow*

✉ bz.nastya96@gmail.com

Аннотация

На сегодняшний день не существует нейропротекторной терапии для пациентов с болезнью Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), кодирующем фермент глюкоцереброзидазу (GCase). Впервые показано восстановление функции GCase на пациент-специфичных клетках пациентов с GBA1-БП при ингибировании протеинкиназы mTOR.

Abstract

To date, there is no neuroprotective therapy for patients with Parkinson's disease (PD) associated with mutations in the *GBA1* gene (GBA1-PD), which encodes the enzyme glucocerebrosidase (GCase). For the first time, restoration of GCase function has been demonstrated in patient-specific cells from GBA1-PD patients through inhibition of the protein kinase mTOR.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, в основе патогенеза которого лежит накопление белка альфа-синуклеина в черной субстанции головного мозга. БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), является наиболее распространенной формой БП с известной этиологией. Мутации в гене *GBA1* приводят к нарушению функции GCase, что проявляется в снижении активности фермента. Предполагается, что это может способствовать накоплению белка альфа-синуклеина. Однако точные молекулярные механизмы GBA1-БП не известны, соответственно, нейропротекторной терапии не существует. Одним из основных подходов для разработки таргетной терапии GBA1-БП является поиск малых молекул, направленных на восстановление функции GCase. Так, сегодня активно ведется поиск и апробация фармакологических шаперонов, приводящих к увеличению активности данного фермента. Однако ни один из представленных препаратов не вошел в клиническую практику, что обуславливает актуальность поиска новых терапевтических мишеней и веществ, направленных на них. Ранее нами в ходе экспрессивного профилирования клеточной и животной моделей паркинсонизма с дисфункцией GCase было выявлено нарушение сигнального пути mTOR [1, 2].

Цель работы заключалась в оценке влияния ингибитора киназной активности mTOR на восстановление функции GCase на пациент-специфичных клетках пациентов с GBA1-БП.

В текущее исследование были включены культура дофаминергических нейронов, дифференцированных из плюрипотентных столовых клеток (ДА-ИПСК), полученных от одного пациента с GBA1-БП, выращенная

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00212).

© А. И. Безрукова, К. С. Башарова, Е. В. Григорьева, С. В. Павлова, Г. В. Байдакова, Е. Ю. Захарова, С. Н. Пчелина, Т. С. Усенко, 2025

в трех линиях, а также первичная культура макрофагов периферической крови, полученная от семи пациентов с GBA1-БП. Клетки культивировались 24 ч в присутствии ингибитора активности mTOR — Torin 1 в концентрации 100 нМ. Эффективность ингибирования активности mTOR оценивалась по снижению фосфорилированного mTOR (Ser2448) и его субстрата фосфорилированного RPS6 (Ser235/236) методом вестерн-блот. Активность GCase измерялась методом высокоэффективной жидкостный хроматографией в сочетании с тандемной масс-спектрометрией.

Нами впервые было выявлено повышение активности фермента GCase на ДА-ИПСК и первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП при добавлении Torin 1 по сравнению с необработанными культурами клеток ($p < 0{,}0001$).

Таким образом, полученные нами результаты открывают новые возможности для таргетной терапии GBA1-БП, в частности путем модулирования работы протеинкиназы mTOR для восстановления функции GCase.

Литература

1. Usenko T., Bezrukova A., Basharova K. et al. Comparative Transcriptome Analysis in Monocyte-Derived Macrophages of Asymptomatic *GBA* Mutation Carriers and Patients with GBA-Associated Parkinson's Disease // Genes (Basel). 2021. Vol. 12. P. 1545.

2. Usenko T., Bezrukova A., Rudenok M. M. et al. Whole Transcriptome Analysis of Substantia Nigra in Mice with MPTP-Induced Parkinsonism Bearing Defective Glucocerebrosidase Activity // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. P. 12164.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-242

ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ BLICHA ИЗ *BACILLUS LICHENIFORMIS*

STUDY OF THE RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM BLICHA FROM *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Р. В. Березов, А. А. Кудрявцева, И. В. Манухов

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

R. V. Berezov, A. A. Kudryavtseva, I. V. Manukhov

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ berezov.rodion.2001@gmail.com

Аннотация

Система рестрикции-модификации I типа BlichA из *Bacillus licheniformis* была клонирована, экспрессирована и очищена. Подтверждена эндонуклеазная активность комплекса *in vitro*.

Abstract

The type I restriction-modification system BlichA from *Bacillus licheniformis* was cloned, expressed and purified. Endonuclease activity of the complex was confirmed *in vitro*.

Системы рестрикции-модификации I типа (RMI) широко распространены в бактериальных клетках и помогают им защищаться от чужеродной ДНК, такой как ДНК бактериофагов. Обычно такие системы представляют собой комплекс из пяти белков: двух R-субъединиц, определяющих эндонуклеазную активность, двух M-субъединиц, обеспечивающих метилазную активность, и S-субъединицы, отвечающей за узнавание неметилированного сайта на ДНК [1].

В настоящей работе изучалась система BlichA из термофильных бактерий *Bacillus licheniformis*. Набор генов, кодирующих функциональный комплекс, был клонирован в экспрессионный вектор pIR-DPAl. Помимо трех генов *hsdR1*, *hsdM1* и *hsdSIB*, в опероне присутствует дополнительный ген *hsdIA* с неизвестной функцией. Для очистки комплекса к C-концу R-субъединицы была добавлена 6×His-метка.

Проверка работы системы рестрикции-модификации *in vivo* проводилась в штамме с отключенной собственной системой RMI, а именно в *Escherichia coli* TG1. Экспрессию комплекса для выделения проводили в штамме *E. coli* NiCo21(DE3). Эффективность работы комплекса оценивали методом посева фага [2]. Для двух клонов была подтверждена активность RMI. Очистку комплекса BlichA осуществляли с использованием никелевой аффинной хроматографии.

Эндонуклеазную активность комплекса подтвердили *in vitro* на плазмиде, содержащей единичный сайт узнавания. Таким образом, система рестрикции-модификации I типа BlichA была успешно клонирована, экспрессирована, очищена, а также проверена ее эндонуклеазная активность *in vitro*.

Литература

1. Murray N. E. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle) // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64. P. 412–434.

2. Zavil'gel'skii G. B. et al. Weakening of bacteriophage lambda EcoK DNA restriction in the presence of plasmid pKM101 ard+. I. General characteristics and genetic localization // Molekuliarnaya Biologiya. 1984. Vol. 18, No. 6. P. 1590–1596.

© Р. В. Березов, А. А. Кудрявцева, И. В. Манухов, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-243

ДИЗАЙН ГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭКСПОНИРОВАНИЕ АНТИГЕНА НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ *

DESIGN OF GENE CONSTRUCTS PROVIDING EXPOSE OF THE ANTIGEN ON THE CELL SURFACE

Е. Е. Буркова, И. М. Переверзев, И. А. Бахно,
К. И. Яковлева, И. С. Довыденко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. E. Burkova, I. M. Pereverzev, I. A. Bakhno,
K. I. Yakovleva, I. S. Dovydenko

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ burkova199102@gmail.com

Аннотация

Цитоплазматический хвост S-белка SARS-CoV-2 играет важную роль во внутриклеточном транспорте и перемещении гликопротеина к плазматической мембране. Понимание внутриклеточного транспорта S-белка и его транслокации на плазмалемму имеет важное значение для разработки мРНК вакцин, кодирующих полноразмерный S-белок. Рациональное распределение антигена в клетке может снизить дозу вводимой вакцины, что, возможно, приведет к минимизации побочных эффектов вакцин.

Abstract

The cytoplasmic tail of the S protein plays an important role in intracellular transport and translocation of the glycoprotein to the plasma membrane. Understanding the intracellular trafficking of the S protein and its translocation to the plasma membrane is essential for the development of mRNA or adenovirus vector vaccines encoding the full-length S protein. Rational distribution of the antigen in the cell is likely to reduce the vaccine dosage, thereby minimizing vaccine side effects.

В случае использования мРНК-вакцин для создания стойкого иммунитета недостаточно соблюдения таких условий, как стабильность доставляемой мРНК и высокая эффективность трансляции антигена. Также необходима высокая представленность антигена на поверхности клеток. Для некоторых вирусов не требуется дополнительной модификации мРНК антигена для экспонирования белка на поверхность, а для других белок может оказаться запертым внутри клетки. S-белок SARS-CoV-2 не исключение. В ходе созревания вирионы SARS-CoV-2 проходят через секреторный путь в ERGIC, затем через комплекс Гольджи и антероградную систему, после чего высвобождаются из клеток-хозяев. S-белок содержит сигнальную последовательность в цитоплазматическом хвосте, направляющую его в ЭПР, которая необходима для прохождения через ERGIC [1]. Поэтому основная часть S-белка задерживается во внутриклеточном пространстве. Во время COPI-ретроградного и COPII-антероградного транспорта лишь небольшая часть молекул S-белка транспортируется на поверхность клетки. Однако даже при экспрессии S-белка в отсутствии других структурных белков SARS-COV-2 основная часть S-гликопротеина задерживается внутри клетки [2].

Принимая во внимание вышеизложенное, считаем, что важным является рациональное распределение антигена в клетке, в этом случае S-белка коронавируса SARS-CoV-2. С большой вероятностью это может позволить снизить дозу вводимой вакцины, что, возможно, приведет к минимизации побочных эффектов вакцины.

Основной целью настоящей работы являлся дизайн плазмидных конструкций, обеспечивающих заданную локализацию экспрессируемого S-белка. Дизайн включал модификации цитоплазматического домена S-белка, а также поиск последовательностей 3′-нетранслируемых областей (3′-НТО) мРНК белков, содержащих информацию о транспорте синтезируемого белка на поверхность клетки. В работе выбрана плазмидная конструкция, кодирующая слитый белок turboGFP и трансмембранный/цитоплазматический домены S-белка SARS-CoV-2 с различными модификациями цитоплазматического домена, а также различные 3′-НТО. В качестве 3′-НТО выбраны 3′-НТО мРНК различных белков (секретируемые, цитоплазматические, мембранные),

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-24-20074 в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта № р-74).

© Е. Е. Буркова, И. М. Переверзев, И. А. Бахно, К. И. Яковлева, И. С. Довыденко, 2025

а также вирусная 3′-НТО SARS-CoV-2. Проведена сборка генных конструкций, кодирующих слитый белок turboGFP и трансмембранный/цитоплазматический домены S-белка SARS-CoV-2, а также различные варианты 3′-НТО. На данный момент проведены первичные исследования полученных плазмидных конструкций на культуре клеток HEK293.

Литература

1. Li Q, Liu Y, Zhang L. Cytoplasmic tail determines the membrane trafficking and localization of SARS-CoV-2 spike protein // Front Mol. Biosci. 2022. Vol. 9. P. 1004036.

2. Cattin-Ortolá J., Welch L. G., Maslen S. L. et al. Sequences in the cytoplasmic tail of SARS-CoV-2 Spike facilitate expression at the cell surface and syncytia formation // Nat Commun. 2021. Vol. 12. P. 5333.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-244

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИТИОФОСФАТОВ ГЛУТАТИОНА В КАЧЕСТВЕ КЛЕТОЧНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ*

STUDY OF GLUTATHIONE DITHIOPHOSPHATES AS CELLULAR ANTIOXIDANTS

М. В. Валинурова, Р. А. Ишкаева, А. А. Ергешов, И. С. Низамов, Д. В. Салахиева, Т. И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет

M. V. Valinurova, R. A. Ishkaeva, A. A. Yergeshov, I. S. Nizamov, D. V. Salakhieva, T. I. Abdullin

Kazan Federal University

✉ m.valinurova@bk.ru

Аннотация

Антиоксидантная терапия является важной стратегией в лечении заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом. В работе оценены некоторые антиоксидантные и цитопротекторные эффекты дитиофосфатов глутатиона в качестве новых доноров сероводорода и глутатиона.

Abstract

Antioxidant therapy is an important strategy in the treatment of diseases associated with oxidative stress. In this work, some antioxidant and cytoprotective effects of glutathione dithiophosphates as new donors of hydrogen sulfide and glutathione were assessed.

Окислительный стресс (ОС) играет важную роль в развитии многих травматических и дегенеративных заболеваний кожи. Одним из факторов, провоцирующих процессы дегенерации и перерождения тканей кожи, является ультрафиолетовое (УФ) излучение, способное повреждать биомолекулы напрямую и посредством индукции ОС. Кроме того, УФ-излучение может применяться для моделирования повреждения кожи.

Важной стратегией в лечении повреждений кожи является антиоксидантная терапия, направленная на защиту клеток и ингибирование ОС. Одними из наиболее перспективных антиоксидантов являются серосодержащие молекулы, которые не только ингибируют ОС, но также играют важную регуляторную роль. В работе исследованы гибридные антиоксиданты на основе амфифильных солей восстановленного и окисленного глутатиона и O,O-диорганилдитиофосфорной кислоты (DTP), являющиеся комбинированными донорами глутатиона, сероводорода и продуктов их редокс-превращений [1, 2].

Для изучения антиоксидантных и цитопротекторных эффектов дитиофосфатов глутатиона использовали кератиноциты человека линии HaCaT и фибробласты мыши линии 3T3 в качестве моделей клеток эпидермиса и дермы, принимая во внимание способность длинноволнового УФ-излучения проникать в глубокие слои кожи. Клетки подвергали действию УФ-излучения (365 нм, 8 Дж/см^2).

Действие УФ-излучения вызывало умеренное повышение уровня активных форм кислорода (АФК) как в 3T3-фибробластах, так и в кератиноцитах HaCaT, которое сопровождалось значительным снижением их жизнеспособности, потенциалов плазматической и митохондриальной мембран, что свидетельствует о повреждающем и цитотоксическом действии УФ. В этих условиях дитиофосфаты глутатиона проявили антиоксидантный эффект в микромолярных концентрациях, снизив сверхпродукцию АФК до уровня интактных клеток. Кроме того, УФ-излучение приводило к выраженным морфологическим изменениям цитоплазмы клеток и фрагментации ядер. Для количественной оценки степени повреждения клеток рассчитывали площадь клеточных ядер, окрашенных DAPI, с использованием программы NIH ImageJ 1.48v. Установлено, что дитиофосфаты глутатиона проявили дозозависимый ингибирующий эффект на повреждение обеих клеточных линий.

В совокупности полученные данные показывают, что дитиофосфаты глутатиона обладают антиоксидантной и цитопротекторной активностью в отношении клеток млекопитающих при повреждении УФ-излучением.

* Исследование выполнено за счет субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2025-0002).

© М. В. Валинурова, Р. А. Ишкаева, А. А. Ергешов, И. С. Низамов, Д. В. Салахиева, Т. И. Абдуллин, 2025

Результаты представляют интерес для создания улучшенных антиоксидантов для ингибирования заболеваний, ассоциированных с ОС.

Литература

1. Ishkaeva R.A., Nizamov I.S., Blokhin D.S. et al. Dithiophosphate-induced redox conversions of reduced and oxidized glutathione // Molecules. 2021. Vol. 26 (10).

2. Ishkaeva R.A., Khaertdinov N.N., Yakovlev A.V. et al. Characterization of glutathione dithiophosphates as long-acting H2S donors // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24 (13).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-245

ПОЛУЧЕНИЕ МРНК-КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА*

PRODUCTION OF MRNA CONSTRUCTS ENCODING ANTIBODIES AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Д. И. Вахитов, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко

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

D. I. Vahitov, D. N. Kisakov, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ danilvahitov2001@mail.ru

Аннотация

Проблема распространения вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и ограниченная эффективность серопрофилактики требуют новых подходов. В работе представлены результаты по получению мРНК-конструкций, кодирующих вируснейтрализующие антитела к ВКЭ. Конструкции спроектированы *in silico* с использованием комплекса биоинформатических методов, синтезированы *in vitro* и верифицированы.

Abstract

The problem of the spread of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) and the limited effectiveness of seroprophylaxis require new approaches. This paper presents the results of obtaining mRNA constructs encoding virus neutralizing antibodies to TBEV. The structures were designed in silico using a set of bioinformatic methods, synthesized in vitro and verified.

На протяжении последних двадцати лет климатические и антропогенные факторы привели к значительным изменениям ареала вируса клещевого энцефалита. Это способствует распространению переносчиков в новые регионы, включая ранее незатронутые территории. Особую угрозу представляет экспансия дальневосточного и сибирского субтипов ВКЭ в европейскую часть России, традиционно эндемичную для менее патогенного европейского субтипа, что приводит к более тяжелому течению заболевания с серьезными осложнениями. Единственным методом экстренной профилактики остается введение донорской сыворотки, содержащей специфические иммуноглобулины против вируса клещевого энцефалита. Ввиду ограниченной эффективности такой профилактики и недостаточностью донорской крови для получения препарата интерес к терапевтическим антителам значительно возрос. Успех мРНК-вакцин против COVID-19 стимулировал применение этой технологии для терапии различных заболеваний, открывая новые перспективы для разработки и доставки антител.

Целью работы являлась разработка *in silico* и создание генетических конструкций мРНК, кодирующих вируснейтрализующие терапевтические антитела против вируса ВКЭ.

Для достижения цели использовали комплекс биоинформатических методов: моделирование трехмерной структуры антител (RosettaAntibody v3, ABodyBuilder v2, AlphaFold v3) для анализа структурных особенностей; молекулярный докинг (AutoDock Vina v1.1.2) и расчет свободной энергии связывания (MM/GBSA) для оценки аффинности и стабильности комплекса антитело-антиген; проверку молекулярной динамики с помощью GROMACS v2025.0; проверку на Т-клеточные эпитопы (NetMHCIIpan v4.0); анализ гомологии с человеческими белками (BLAST/UniProt); оценку физико-химических свойств (Aggrescan v2.0, TANGO, CamSol, ProtParam). Генетические конструкции разработали в SnapGene (v8.0.0), а их кодоновый состав оптимизировали с помощью JCAT.

Разработаны три варианта конструкций: (I) коктейль, состоящий из 4 мРНК, кодирующих тяжелую и легкую цепь двух МКА Т025 и Т028; (II) биспецифические одноцепочечные антитела, кодирующие вариабельные участки через линкер; (III) CrossMab$^{CH1\text{-}CL}$, кодирующие модифицированные IgG, содержащие сразу два вариабельных участка разных антител (Т025 и Т028). Этот подход позволяет одновременно нацелить антитело на два эпитопа вируса клещевого энцефалита, что потенциально повышает эффективность нейтрализации и снижает сложности при дизайне мРНК-конструкций.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

© Д. И. Вахитов, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, 2025

Был произведен синтез вариабельных участков антител и получены ДНК-матрицы для синтеза мРНК. Подтверждение последовательности матрицы осуществляли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования по методу Сенгера. Линеаризованные ДНК-матрицы транскрибировали *in vitro*, полученные мРНК анализировали электрофорезом в агарозном геле. В результате работы были смоделированы и сконструированы мРНК-конструкции, биологическая специфичность которых будет исследована на мышах, зараженных ВКЭ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-246

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ НОВОГО IRES ДЛЯ КОЛЬЦЕВЫХ РНК-ВЕКТОРОВ

STUDYING OF A NOVEL IRES EXPRESSION FOR CIRCULAR RNA-VECTORS

В. М. Вахтинский, И. Л. Тутыхина, А. Ш. Джарулаева, М. М. Шмаров

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

V. M. Vakhtinskii, I. L. Tutykhina, A. Sh. Dzharulaeva, M. M. Shmarov

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ vakhvladimir@yandex.ru

Аннотация

Кольцевые мРНК векторы являются перспективной платформой для создания вакцинных препаратов. Одним из главных факторов, определяющих уровень экспрессии кольцевых векторов, является внутренний сайт посадки рибосомы IRES (*Interna ribosome entering site*). В работе был создан кольцевой мРНК-вектор, содержащий IRES риновируса Б6 и обеспечивающий более чем двухкратный рост экспрессии целевого белка по сравнению с IRES вируса Коксаки Б3.

Abstract

Circular mRNA is a perspective vaccine platform. One of the main factors, determing expression level of circular vectors is Internal ribosome entering site (IRES). During this research we obtained circular mRNA vector, containing IRES of Rhinovirus B6, that has at least double time higher expression level against IRES of Coxackie virus B3.

Векторы на основе мРНК в последние годы стали новой платформой для создания не только вакцин, но и терапевтических препаратов. Среди мРНК-векторов выделяют линейные кэп-зависимые и кольцевые кэп-независимые.

Линейные кэп-зависимые векторы являются наиболее изученным и наиболее широко используемыми, ярким примером служат вакцины от коронавируса SARS-CoV-2 [1]. Однако линейные мРНК-векторы обладают такими недостатками, как нестабильный полиаденинновый хвост, а также высокая стоимость кэпирования [2].

Кольцевые кэп-независимые векторы являются сравнительно новыми, однако в настоящее время наблюдается рост интереса к этому типу векторов благодаря более продолжительной экспрессии, большей стабильности и меньшей стоимости, чем линейные [3].

Важнейшим элементом, влияющим на уровень экспрессии целевого белка кольцевыми мРНК-векторами, является внутренний сайт посадки рибосомы (*Interna ribosome entering site*, далее IRES). Наиболее распространенным являются IRES вируса Коксаки Б3 (CVB3), а также вирус энцефаломиокардита (ECMV). Однако они обладают низкими уровнями экспрессии, вследствие этого на протяжении последних лет ведутся активные поиски новых IRES, а также модификация существующих векторов [4].

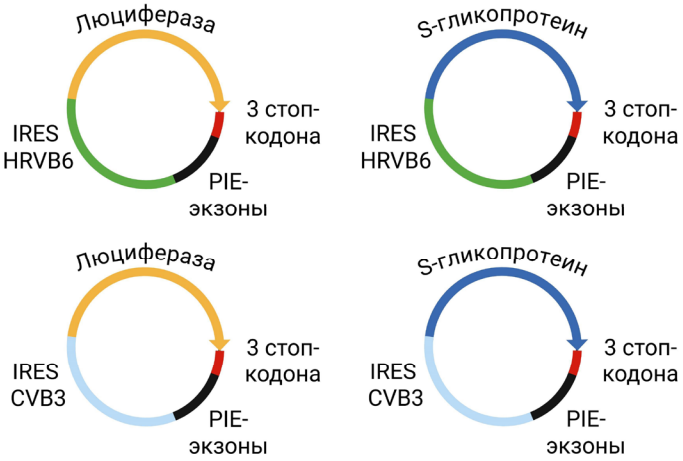
Целью нашей работы являлось изучение экспрессии трансгена кольцевым вектором, содержащим IRES риновируса Б6 (HRVB6), и ее сравнение с экспрессией трансгена кольцевым вектором, содержащим распространенным IRES вируса Коксаки Б3 (CVB3) *in vitro* на клетках HEK293.

В ходе работы было получено четыре матрицы для синтеза РНК: две, содержащие ген люциферазы и тот или иной IRES, и две, содержащие ген S-гликопротеина коронавируса SARS-CoV-2 штамм Ухань и аналогичные IRES. Синтез мРНК проводился методом *in vitro* транскрипции, их схемы приведены на рисунке.

Далее, полученной РНК была проведена трансфекция клеток HEK 293. Люциферазная активность измерялась через 18 ч после трансфекции. Относительно контрольных клеток вектор, содержащий IRES риновируса Б6, показал значения люциферазной активности 3672 ± 146 RLU против 1113 ± 177 RLU у вектора, содержащего IRES вируса Коксаки Б3. Разница составила более 3 раз ($P < 0{,}0001$).

Затем проводилось изучение экспрессия целевого антигена. Для этого проводилась трансфекция клеток HEK 293 кольцевыми векторами, несущими ген S-гликопротеина коронавируса SARS-CoV-2. По прошествии 18 ч после трансфекции клетки лизировались. Измерение количества целевого белка проводилось методом ИФА. Кольцевой вектор, содержащий IRES риновируса Б6, показал значения 875 ± 63,7 нг/мл против 245 ± 31,2 нг/мл (CI 95 %) IRES вируса Коксаки Б3. Разница составила более 3,5 раза ($P < 0{,}0001$).

© В. М. Вахтинский, И. Л. Тутыхина, А. Ш. Джарулаева, М. М. Шмаров, 2025



Схематическое изображение
используемых кольцевых мРНК-векторов

Таким образом, в ходе работы был впервые получен кольцевой РНК вектор, содержащий IRES риновируса Б6, который превосходит распространенный IRES вируса Коксаки Б3 не менее чем в 2,5 раза по уровням экспрессии как люциферазы, так и модельного антигена (S-гликопротеина коронавируса SARS-CoV-2). Эти результаты могут быть использованы при разработке препаратов на основе кольцевых мРНК-векторов или модификации существующих векторов.

В дальнейшем планируется сравнить уровни экспрессии полученных векторов на других типах клеток, а также *in vivo*.

Литература

1. Meo S.A., Bukhari I.A., Akram J. et al. COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna Vaccines // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2021. Vol. 25. P. 1663–1669.

2. Leong K.Y., Tham S.K., Poh C.L. Revolutionizing immunization: a comprehensive review of mRNA vaccine technology and applications // Virol. J. 2025. Vol. 22. P. 71.

3. Wan J., Wang Z., Wang L. et al. Circular RNA vaccines with long-term lymph node-targeting delivery stability after lyophilization induce potent and persistent immune responses // mBio. 2024. Vol. 15. P. e0177523.

4. Wesselhoeft R.A., Kowalski P.S., Anderson D.G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells // Nat. Commun. 2018. Vol. 9. P. 2629.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-247

КЛОНИРОВАНИЕ, НАРАБОТКА И ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ДЛЯ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ *

CLONING, PRODUCTION AND ISOLATION OF PROTEINS FOR RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION

Е. С. Галабурдина[1,2], И. П. Оскорбин[1,2], М. Л. Филипенко[1]

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

E. S. Galaburdina[1,2], I. P. Oskorbin[1,2], M. L. Filipenko[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ e.galaburdina@g.nsu.ru

Аннотация

Определены оптимальные условия (температура, штамм *E. coli*) для препаративной наработки белков, задействованных в рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА). Получена плазмида для наработки белка SSB фага T4. Белки UvsX, UvsY, креатинкиназа М свиньи, белок SSB *T. thermophilus* наработаны и очищены до 85%-й электрофоретической чистоты, подтверждено отсутствие примесных нуклеаз в их препаратах.

Abstract

Expression of recombinant proteins for recombinase polymerase amplification (RPA) was optimized in terms of the *E. coli* strain and expression temperature. The T4 phage SSB protein was cloned in an expression plasmid. UvsX, UvsY proteins, porcine creatine, kinase type M, *T. thermophilus* SSB protein were produced and purified up to 85 % electrophoretic purity without a confirmed residual nuclease activities.

Введение

Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА) — метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот, основанный на использовании пары олигонуклеотидных праймеров, рекомбиназы, ДНК-полимеразы, белка SSB и креатинкиназы, генерирующей АТФ [1]. Преимущества РПА в создании тест-систем для диагностики инфекционных агентов заключаются в постоянной температуре амплификации, оптимум которой находится в диапазоне 37–42 °C, высокой чувствительности, сравнимой с ПЦР, и необходимости синтеза только двух праймеров в отличие от LAMP, другого популярного метода изотермической амплификации. Денатурация и отжиг праймеров для РПА не требуются, что значительно снижает требования к приборному обеспечению. РПА — удобный и быстрый метод диагностики заболеваний, однако на сегодняшний день производство компонентов для этого вида амплификации в России отсутствует, что затрудняет разработку РПА-тестов. Таким образом, целью настоящей работы было клонирование, наработка в *E. coli* и очистка рекомбинантных белков для рекомбиназной полимеразной амплификации: рекомбиназы UvsX, фактора загрузки рекомбиназы UvsY, SSB-белка фага T4 и креатинкиназы типа М *Sus scrofa* (КК-М).

Материалы и методы

Нуклеотидную последовательность гена 32-го бактериофага T4 (T4 SSB-белка) наработали с помощью ПЦР по матрице геномной ДНК фага T4, а последовательность КК-М свиньи наработали посредством ОТ-ПЦР по матрице РНК, выделенной из мышц *Sus scrofa*. Полученные ампликоны клонировали в вектор pAL2-T ТА-клонированием, затем перенесли в экспрессионный вектор pET23a рестриктазно-лигазным клонированием, наличие необходимых вставок в векторах подтвердили ПЦР-скринингом. Отсутствие нуклеотидных замен в клонированных последовательностях установили секвенированием по Сэнгеру.

Для наработки в *E. coli* белков UvsX, UvsY и белка SSB *Thermus thermophilus* использовали полученные ранее в лаборатории экспрессионные плазмиды с кодирующими последовательностями этих белков. Оптимизировали условия наработки UvsX, UvsY и креатинкиназы типа М, варьируя температуру инкубации с 1 мМ ИПТГ

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300657-2).

© Е. С. Галабурдина, И. П. Оскорбин, М. Л. Филипенко, 2025

(18, 25, 37 °C) и штамм *E. coli* — BL21 (DE3) pLysS и Rosetta Blue (DE3). Для наработки белка SSB *T. thermophilus* оптимизировали условия (температуру и штамм *E.coli*) автоиндукции по Стадиеру. В подобранных условиях наработали белки в 1 л среды LB. Рекомбинантные КК-М, UvsX, UvsY очистили при помощи аффинной и ионообменной хроматографии, а белок SSB *T. thermophilus* — аффинной хроматографией. Степень чистоты рекомбинантных белков и их количество оценили денатурирующим гель-электрофорезом по Лэммли. Нуклеазные активности в препаратах белков оценили с помощью инкубации с линейной ДНК фага Т7 и плазмидой pQE30 с последующим гель-электрофорезом в агарозном геле.

Результаты

Получены плазмиды на основе вектора pET23a для наработки белка SSB бактериофага Т4 и креатинкиназы типа М *Sus scrofa* без нуклеотидных замен, приводящих к аминокислотным заменам. Проведен подбор оптимальных условий (температура, штамм *E. coli*) для наработки рекомбинантных белков UvsX (37 °C, Rosetta Blue (DE3)), UvsY (37 °C, BL21 (DE3) pLysS), КК-М свиньи (25 °C, BL21 (DE3) pLysS) и белка SSB *T. thermophilus* (автоиндукция по Стадиеру, 25 °C, BL21 (DE3) pLysS). В клетках *E. coli* наработаны и очищены с электрофоретической чистотой не менее 85 % белки UvsX (3,6 мг белка из 3 г биомассы), UvsY (6,8 мг белка из 4,3 г биомассы), КК-М *Sus scrofa* (75 мг белка из 4,6 г биомассы), белок SSB *T. thermophilus* (2,6 мг белка из 2 мг биомассы).

Заключение

Полученные результаты по клонированию кодирующих последовательностей, оптимизации условий наработки в *E. coli* и очистке белков, необходимых для рекомбиназной полимеразной амплификации, позволят получить полный набор компонентов для создания тест-систем на основе РПА.

Литература

1. Piepenburg O., Williams C. H., Stemple D. L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins // PLoS Biology. 2006. Vol. 4, No. 7. P. 1115–1121.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-248

ВЛИЯНИЕ СПЛЕНЭКТОМИИ НА ПОПУЛЯЦИЮ СИНУСОИДАЛЬНЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В МОДЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОСЛЕ 70%-Й РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ МЫШИ *

EFFECT OF SPLENECTOMY ON THE SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELL POPULATION IN A REGENERATION MODEL AFTER 70 % LIVER RESECTION IN MICE

Е. А. Ганцова[1,2], П. А. Вишнякова[1,3], М. В. Кузнецова[1,3], А. В. Ельчанинов[1,2]

[1]НИИ морфологии человека им. акад. А. П. Авцына, Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва
[2]НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва
[3]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова, Москва

E. A. Gantsova[1,2], P. A. Vishnyakova[1,3], M. V. Kuznetsova[1,3], A. V. Elchaninov[1,2]

[1]Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow
[2]Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow
[3]Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

✉ gantsova_ea@rudn.ru

Аннотация

Исследовали популяцию синусоидальных эндотелиальных клеток в печени, подвергшейся резекции 70 % органа, в динамике на 1, 3 и 7-е сутки после резекции, с предварительным удалением селезенки и без него. С помощью проточной цитометрии определили количество VCAM-1 и VE-кадгерин-положительных клеток. Анализ транскриптомов микрочипов Clariom™ S Assay выявил обогащение следующих сигнальных путей: путь PI3K-Akt-mTOR, путь фокальной адгезии и путь хемокинов.

Abstract

The population of sinusoidal endothelial cells in the liver with 70 % resection was studied dynamically on days 1, 3 and 7 after resection, with and without splenectomy. Using flow cytometry, the number of VCAM-1 and VE-cadherin-positive cells was determined. Analysis of the transcriptomes of the Clariom™ S Assay microarrays revealed enrichment of the following signaling pathways: the PI3K-Akt-mTOR pathway, the focal adhesion pathway and the chemokine pathway.

Введение

Обширные клинические и лабораторные исследования показывают, что спленэктомия ускоряет регенерацию печени, однако точные механизмы этого эффекта остаются малоизученными. Цель исследования — оценить влияние предшествующей спленэктомии на состояние синусоидальных эндотелиальных клеток (СЭК) и иммунофенотип лимфоцитов в остаточной печени после 70%-й резекции на мышиной модели.

Материалы и методы

Мыши, которым за 7-е суток до частичной гепатэктомии (70 %) проводили спленэктомию или оставляли селезенку интактной. Фенотипирование СЭК с помощью проточной цитометрии: экспрессия VCAM-1 (CD106), VE-cadherin (CD144), CD31 (PECAM-1), интегрин α5 (CD49e). Апоптоз и пролиферация: Annexin-V+/PI+ и Ki67+ СЭК. Лимфоциты: CD3+ и CD161+ (NK1.1+) клетки в регенерирующей ткани.

Результаты

При анализе иммунного фенотипа синусоидальных эндотелиальных клеток у спленэктомированных животных было выявлено снижение числа VCAM-1 (CD106)+ СЭК на 1-й и 7-й дни после гепатэктомии. Доля VE-cadherin (CD144)+ клеток также уменьшалась к 7-му дню в группе со спленэктомией. Что касается CD31 (PECAM-1), то на 7-е сутки наблюдалась тенденция к снижению числа CD31+ клеток (p = 0,06). Экспрессия интегрина α5 (CD49e) оставалась без значимых изменений в обеих группах. Исследование апоптоза и пролиферации СЭК показало, что на 1-й день после резекции у спленэктомированных животных отмечалось значительно больше апоптотических клеток (Annexin-V+/PI+). На 3-й и 7-й дни апоптоз преимущественно регистрировали

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-24-00040).
© Е. А. Ганцова, П. А. Вишнякова, М. В. Кузнецова, А. В. Ельчанинов, 2025

в группе с сохраненной селезенкой. При этом пролиферация СЭК (Ki67+) была на всех временных точках значительно ниже у животных после спленэктомии, и иных статистически значимых различий выявлено не было. Лимфоцитарная инфильтрация печени также зависела от наличия селезенки. На 3-й день после резекции число CD3+ лимфоцитов существенно снижалось в группе спленэктомии. Кроме того, уже на 1-й день после операции в этой же группе обнаруживалось значительно меньше CD161+ (NK1.1+) клеток, а к 7-му дню сохранялась тенденция к их снижению, хотя она не всегда достигала уровня статистической значимости.

Выводы

Предварительная спленэктомия приводит к подавлению провоспалительной активации синусоидального эндотелия (↓ VCAM-1, VE-cadherin), что сопровождается снижением популяции пролиферирующих СЭК (Ki67+). Перемещение пиков апоптоза: ранний апоптоз в спленэктомированной группе, поздний — в интактной. Уменьшение экспрессии маркеров активации эндотелия коррелирует с уменьшением притока CD3+ и NK1.1+ лимфоцитов — потенциальных ингибиторов регенерации.

Заключение

Таким образом, спленэктомия снижает эндотелиально-опосредованную воспалительную реакцию и лимфоцитарную инфильтрацию, что может способствовать более эффективной регенерации печени.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-249

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОНЪЮГАТА МИРНК — ПЕПТИД С ВЫСОКИМ ВЫХОДОМ

METHOD FOR OBTAINING A SIRNA-PEPTIDE BIOCONJUGATE WITH A HIGH YIELD

О. А. Герасимов, О. Ю. Домашева, Л. Г. Бушина, И. Б. Козлов

Центр стратегического планирования
и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва

O. A. Gerasimov, O. Y. Domasheva, L. G. Bushina, I. B. Kozlov

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA of Russia, Moscow

✉ IKozlov@cspfmba.ru

Аннотация

Процессы биоконъюгации позволяют получить соединения с биологической активностью и структурными фрагментами, обеспечивающими адресную доставку. Подход открывает перспективы их применения как компонентов генной терапии. Разработан метод получения биоконъюгата миРНК с пептидом, который позволяет учесть влияние конкурирующих реакций, снижающих выход продукта.

Abstract

Bioconjugation allows the production of compounds with biological activity and structural fragments that provide targeted delivery. This approach opens up the possibility of using them as components in gene therapy. A method has been developed for producing a bioconjugate of miRNA with a peptide, which takes into account the influence of competing reactions that reduce the yield of the product.

Подходы биоконъюгации включают современные методы, направленные на получение химерных молекул, сочетающих свойства нуклеиновых кислот и пептидов. Подобные соединения являются перспективными для применения в качестве терапевтических лекарственных средств, например для подавления экспрессии генов посредством механизма РНК-интерференции.

Набор методов, позволяющих создать ковалентную связь между двумя компонентами разной природы, широко используется для получения средств таргетной доставки миРНК или других генотерапевтических олигонуклеотидов с помощью пептидов к рецепторам целевых клеток.

Для получения биоконъюгатов миРНК с пептидами широко применяются линкерные молекулы, которые с высокой селективностью образуют ковалентные связи как с функциональными группами пептидной цепи, так и с миРНК. Благодаря контролируемой длине линкеры позволяют задать расстояние между двумя молекулами. Наиболее распространенные линкеры представлены активированными эфирами (например, NHS-эфиры), которые используют для соединения с первичными аминами (NH_2-), а также малеимидами или алкилгалогенидами, применяемыми для проведения специфичной реакции с тиольными (SH)-группами цистеина.

Например, цистеин обеспечивает сайт-направленное введение линкера, что делает функциональную (SH)-группу удобной с точки зрения селективности присоединения миРНК. В то же время в случае отсутствия цистеина в структуре пептида присоединение линкера обеспечивается по α-NH_2-группе или ε-NH_2-группе в боковой цепи лизина, однако их реакционная способность зависит от pH. Так, при pH < 7 они находятся в протонированном состоянии и менее активны, тогда как при pH > 7 селективно взаимодействуют с функциональными центрами линкерной молекулы.

Однако ключевой проблемой при получении биоконъюгатов РНК с другими молекулами, в частности с пептидами, является низкая эффективность конъюгации, обусловленная стерическими препятствиями и конкурирующими побочными реакциями. Мы разработали воспроизводимый метод, обеспечивающий высокую эффективность присоединения пептида к 5′-NH_2-группе РНК-олигонуклеотида через тиольную группу цистеина.

Синтез РНК-олигонуклеотидов проводили амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе Polygen (*Polygen GmbH, Германия*). В процессе синтеза смысловых РНК-последовательностей на финальной стадии присоединяли TFA-аминолинкер C6 фосфорамидит (*Lumiprobe, Россия*). Олигонуклеотиды очищали методом обращенно-фазовой хроматографии. Структуру полученных РНК-олигонуклеотидов подтверждали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС) на соответствие расчетным массам. К 5′-NH_2-группе РНК-олигонуклеотида присоединяли 3-малеимидпропионо-

© О. А. Герасимов, О. Ю. Домашева, Л. Г. Бушина, И. Б. Козлов, 2025

вой кислоты NHS-эфир (*Lumiprobe, Россия*), содержащий N-гидроксисукцинимидную функциональную группу. Реакционную смесь очищали на Zetadex CentriPure N2 (*EmpBiotech, Германия*) с целью отделения олигонуклеотида от непрореагировавшего линкера. Присоединение пептида к модифицированному олигонуклеотиду осуществляли через взаимодействие малеимидной функциональной группы с SH-группой цистеина. Полученный биоконъюгат очищали методом гель-фильтрационной (ГФ) хроматографии и подтверждали структуру с помощью ВЭЖХ/МС. На финальном этапе конъюгат РНК-олигонуклеотид-пептид дуплексировали с антисмысловой последовательностью РНК. Готовый биоконъюгат миРНК-пептид очищали с помощью ГФ ВЭЖХ и подтверждали структуру с помощью ВЭЖХ/МС.

Разработанный метод получения биоконъюгата миРНК с пептидом позволяет устранить ограничения, связанные с низкой эффективностью или возникновением конкурирующих реакций. Подбор условий присоединения линкера обеспечил высокий выход целевого продукта (85 %). Применение предложенного метода в будущем позволит сократить время и себестоимость получения биоконъюгатов олигонуклеотидов с различными пептидами.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-250

ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА МЕЛАТОНИНА *SNAT1* И *SNAT2* У СОРТОВ ТОМАТА *SOLANUM LYCOPERSICUM* И ДИКОРАСТУЩИХ ОБРАЗЦОВ *SOLANUM LYCOPERSICUM* VAR. *CERASIFORME*

CHARACTERIZATION AND ANALYSIS OF KEY MELATONIN BIOSYNTHESIS GENES *SNAT1* AND *SNAT2* IN TOMATO *SOLANUM LYCOPERSICUM* CULTIVARS AND WILD ACCESSIONS *SOLANUM LYCOPERSICUM* VAR. *CERASIFORME*

И. М. Горюшко[1], О. К. Анисимова[1,2]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

I. M. Goryushko[1], O. K. Anisimova[1,2]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow*

✉ lelikanis@yandex.ru

Аннотация

Определена вариабельность генов биосинтеза мелатонина *SNAT* у сортов и образцов томата. Выявлены различия как в экзонных, так и в интронных последовательностях. Поиск консервативных мотивов белков SNAT выявил три мотива, характерные только для SNAT1. Различия в составе *cis*-элементов в промоторных областях могут указывать на возможность активации *SNAT1* и *SNAT2* разными типами фитогормонов. Показана сортоспецифичность экспрессии *SNAT1-2* у сортов томата.

Abstract

Variability of melatonin biosynthesis genes *SNAT* in tomato cultivars and accessions was determined. Differences were found in both exon and intron sequences. Search for conservative motifs in SNAT proteins revealed three motifs characteristic only of SNAT1. Differences in the composition of *cis*-elements in promoter regions may indicate the possibility of *SNAT1* and *SNAT2* activation by different types of phytohormones. Cultivar-specificity of *SNAT1-2* expression in tomato cultivars was shown.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) — важный вторичный метаболит растений, являющийся антиоксидантом и фитогормоном, вовлеченным во многие физиологические процессы, в том числе в ответы на различные стрессовые факторы. Путь биосинтеза мелатонина у растений включает четыре фермента: триптофандекарбоксилазу (TDC), триптамин-5-гидроксилазу (T5H), серотонин-N-ацетилтрансферазу (SNAT) и N-ацетилсеротонин-O-метилтрансферазу (ASMT). Ключевым ферментом считается SNAT, катализирующий образование непосредственного предшественника мелатонина. Несмотря на значимость и интерес к растительному мелатонину, данные о генах, кодирующих эти ферменты, ограничены. Целью работы стал внутривидовой анализ и характеристика генов *SNAT* у томата *Solanum lycopersicum* L.

Для анализа были выбраны 10 сортов *S. lycopersicum* и 5 образцов подвида *S. lycopersicum var. cerasiforme*, геномы которых представлены в NCBI. У всех анализируемых образцов томата были найдены оба известных гомолога *SNAT1* и *SNAT2*. При этом оба гена показали крайне высокую консервативность кодирующих последовательностей: только у четырех *S. lycopersicum* в *SNAT1* была обнаружена единственная SNP (C534T), не приводящая к аминокислотной замене, а у одного образца *S. lycopersicum var. cerasiforme* (BGV006768) — пять SNPs (один из которых приводит к замене P94L) и один трехнуклеотидный индель в первом экзоне. Вариабельность интронных последовательностей была выше. Было найдено 119 SNP и 26 инделей длиной от 1 до 11 п. н. и одна более протяженная — 37 п. н. Наименьшая гомология геномной последовательности *SNAT1* составила 98,16 % (MicroTom/BGV006768). В безинтронном гене *SNAT2* был найден единственный индель (3 п. н.) у *S. lycopersicum var. cerasiforme* BGV008042.

Анализ белковых последовательностей показал наличие функционального ацетилтрансферазного домена NAT_SF (cd04301) и коэнзим А-связывающего кармана в обоих гомологах SNAT. Поиск консервативных мотивов выявил пять общих для SNAT1 и SNAT2 мотивов (два из которых содержат функциональный домен NAT_SF) и три мотива, характерные только для SNAT1. Выявленные аминокислотные замены белковых последовательностей разных сортов практически не повлияли на предсказанную 3D-структуру белков SNAT. Однако 3D-структуры SNAT1 и SNAT2 существенно различались между собой.

© И. М. Горюшко, О. К. Анисимова, 2025

Промоторные области генов *SNAT* также имели высокий уровень внутривидовой гомологии: минимальные значения составили 98,65 (MicroTom/BGV006768) и 97,86 % (MicroTom/BGV008042) для *SNAT1* и *2* соответственно. Были найдены как однонуклеотидные замены, так и индели. В промоторных областях (~ 2000 пн до старт-кодона) обоих гомологов *SNAT* были найдены *cis*-действующие элементы, связанные с реакциями на гормоны, стрессы и освещенность. При этом из группы гормон-зависимых элементов только у *SNAT1* присутствовали элементы ответа на ауксин (AuxRR-core, TGA-element) и гиббереллин (GARE-motif), а у *SNAT2* — на абсцизовую кислоту (ABRE); элементы ответа на салициловую кислоту (TCA-element) и этилен (ERE) присутствовали у обоих гомологов. Это может указывать на возможность активации генов *SNAT1* и *SNAT2* разными типами фитогормонов. *Cis*-действующих элементов связанных с освещенностью в промоторах *SNAT2* было представлено больше, чем в *SNAT1* (10 и 8 соответственно), а связанных с реакциями на стрессы, напротив, меньше (12 и 8), что может указывать на разную степень вовлеченности *SNAT1* и *SNAT2* в реакции на разные типы внешних факторов. Помимо этого, только у *SNAT1* было найдено три элемента AAGAA-motif, связанных с процессами развития (вторичное развитие ксилемы). Также была выявлена разница между *S. lycopersicum* (MicroTom) и *S. lycopersicum var. cerasiforme* (BGV006768 и BGV008042 для *SNAT1* и *SNAT2* соответственно). Так, в промоторе *SNAT1* у образца BGV006768, по сравнению с MicroTom, некоторые мотивы отсутствовали (GARE-motif, MYB), были представлены в другом количестве (дополнительный GA-motif, отсутствовал один из двух TCT-motif) или появлялись новые (ARE). В промоторе *SNAT2* у BGV008042 отсутствовал G-box и ABRE, однако были найдены дополнительные мотивы ERE (4), TCA-element (1) и MYC (1).

Для экспрессионного анализа были выбраны два сорта томата: Гном и Отрадный. В результате была выявлена межсортовая разница в экспрессии обоих генов *SNAT* в листьях: более высокий уровень наблюдался у сорта Отрадный (относительный уровень транскриптов 0,33/0,85 для *SNAT1* и *SNAT2* соответственно), а более низкий — у сорта Гном (0,17/0,45). В целом экспрессия гена *SNAT2* была выше, чем *SNAT1* у обоих проанализированных сортов, что совпадает с данными транскриптомов сортов Heinz 1706 и MicroTom.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-251

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛАМИДОВ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ *

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACID ETHANOLAMIDES

Е. С. Громова[1,2], А. И. Пономаренко[1], Д. Н. Ивашкевич[1,2], А. А. Егораева[1], Р. М. Султанов[1], И. В. Манжуло[1]

[1] *Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток*
[2] *Школа медицины и наук о жизни, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*

E. S. Gromova[1,2], A. I. Ponomarenko[1], D. N. Ivashkevich[1,2], A. A. Egoraeva[1], R. M. Sultanov[1], I. V. Manzhulo[1]

[1] *Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok*
[2] *School of Medicine and Life Sciences, Far Eastern Federal University, Vladivostok*

✉ gromova.eser@dvfu.ru

Аннотация

Проведенное исследование показало, что этаноламиды омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) оказывают направленное действие на функциональную активность и метаболизм клеток микроглии мыши линии SIM-A9. Установлены клеточные и молекулярные мишени реализации антиоксидантной и противовоспалительной активности исследуемых липидных соединений из доступного дальневосточного сырья.

Abstract

The conducted study showed that ethanolamides of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have a targeted effect on the functional activity and metabolism of SIM-A9 mouse microglial cells. Cellular and molecular targets for the implementation of antioxidant and anti-inflammatory activity of the studied lipid compounds from available Far Eastern raw materials were established.

Заболевания нервной системы занимают третье место в мире по инвалидизации трудоспособного населения, что определяет их высокую социальную значимость [1]. Ключевым звеном нейродегенеративных патологий является хроническое нейровоспаление, в основе которого лежит дисфункция астроцитов и микроглии. Глиальные клетки, будучи основной поддерживающей структурой нервной системы, играют важную роль в регуляции воспалительных процессов, а нарушение их регуляторных функций приводит к усиленной продукции провоспалительных цитокинов, окислительному стрессу и гибели нейронов, что усугубляет патологические изменения в центральной нервной системе (ЦНС) [2]. Ограниченный спектр эффективных препаратов требует формирования многокомпонентных терапевтических схем. Одно из направлений терапии нейровоспаления основано на использовании производных омега-3 ПНЖК, в частности этаноламидов, которые в 10–100 раз превосходят по эффективности своих метаболических предшественников [3].

Целью исследования является подробное изучение механизмов действия этаноламидов ПНЖК в регуляции воспаления, их влияния на микроглию, а также оценку их терапевтического потенциала при нейродегенеративных заболеваниях.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи: оценить уровень цитотоксического действия этаноламидов ПНЖК, влияние на перекисное окисление липидов, а также на синтез маркера цитотоксического фенотипа микроглии CD86, провоспалительных цитокинов IL-6, TNF-α и супрессорного маркера Arg-1 в ЛПС-индуцированной культуре клеток микроглии мыши SIM-A9. А также определить активацию ядерных рецепторов PPAR-α и PPAR-γ как вероятного механизма реализации терапевтического действия этаноламидов омега-3 ПНЖК и изучить ASAHL-зависимый путь их метаболизма в культуре клеток микроглии мыши SIM-A9.

Объектом исследования является группа липидных соединений, синтезированных из омега-3 ПНЖК жира иваси (*Sardinops melanostictus*): этаноламиды докозагексаеновой (DHEA), эйкозапентаеновой (EPEA) и стеаридоновой (SDEA) кислот. Соединения были получены в лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН и исследовались в концентрации 10 мкМ. Нами использовалась линия клеток микроглии мыши SIM-A9 (CRL-3265). Для моделирования воспаления выбран бактериальный липополисахарид (ЛПС) в концентрации 1 мкг/мл.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00048).

© Е. С. Громова, А. И. Пономаренко, Д. Н. Ивашкевич, А. А. Егораева, Р. М. Султанов, И. В. Манжуло, 2025

Первоначально был проанализирован уровень цитотоксического и цитопротекторного действия исследуемых соединений методом MTS. Далее была проведена серия экспериментов на модели ЛПС-индуцированного воспаления в культуре клеток микроглии. С помощью флуоресцентных зондов анализировали антиоксидантный потенциал. Оценку свободнорадикальных процессов проводили с помощью определения конечных продуктов перекисного окисления липидов, в частности малонового диальдегида (MDA-тест). Противовоспалительное действие этаноламидов исследовали методом вестерн-блоттинг, изучая влияние синтеза TNF-α и маркера CD86. Также с помощью ПЦР в режиме реального времени наблюдали уровень экспрессии IL-6 и Arg-1. Количественную оценку синтеза рецепторов PPAR-α и PPAR-γ и фермента внутриклеточного метаболизма ASAHL проводили методом вестерн-блоттинг.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии цитотоксического действия у всех исследуемых соединений. Установлено, что SDEA, EPEA и DHEA подавляют продукцию внутриклеточного NO, ROS, а также ингибируют синтез малонового диальдегида (рис. 1).

Показано снижение синтеза TNF-α, маркера провоспалительной активации микроглии CD86, а также подавление экспрессии IL-6 и Arg-1 (рис. 2).

Механизм действия исследуемых соединений, вероятно, связан с агонизмом к рецепторам PPAR-α и PPAR-γ, сопровождающимся усилением синтеза этих белков в культуре клеток микроглии. Внутриклеточный метаболизм липидов опосредован ферментом ASAHL, синтез которого также увеличивался при обработке веществами.

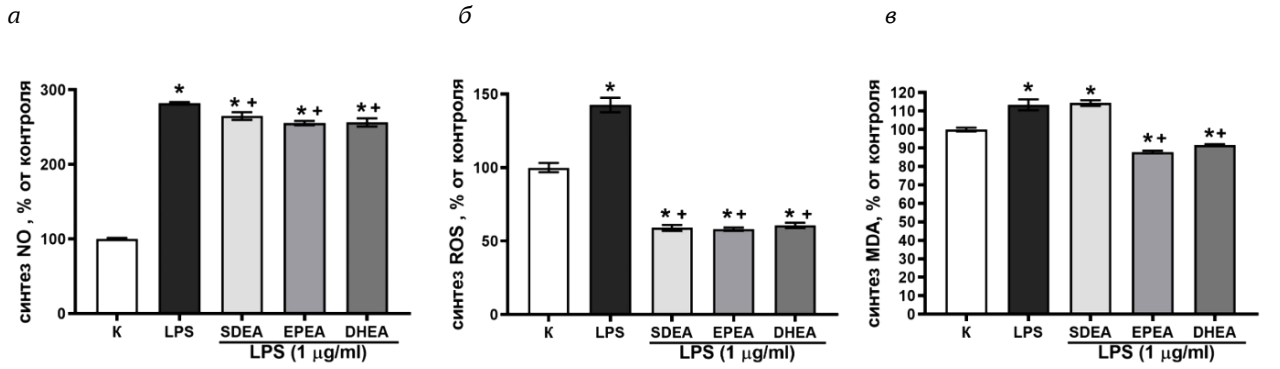


Рис. 1. Влияние SDEA, EPEA и DHEA на уровень продукции NO (*а*), ROS (*б*) и MDA (*в*) в ЛПС-индуцированных клетках микроглии мыши SIM-A9

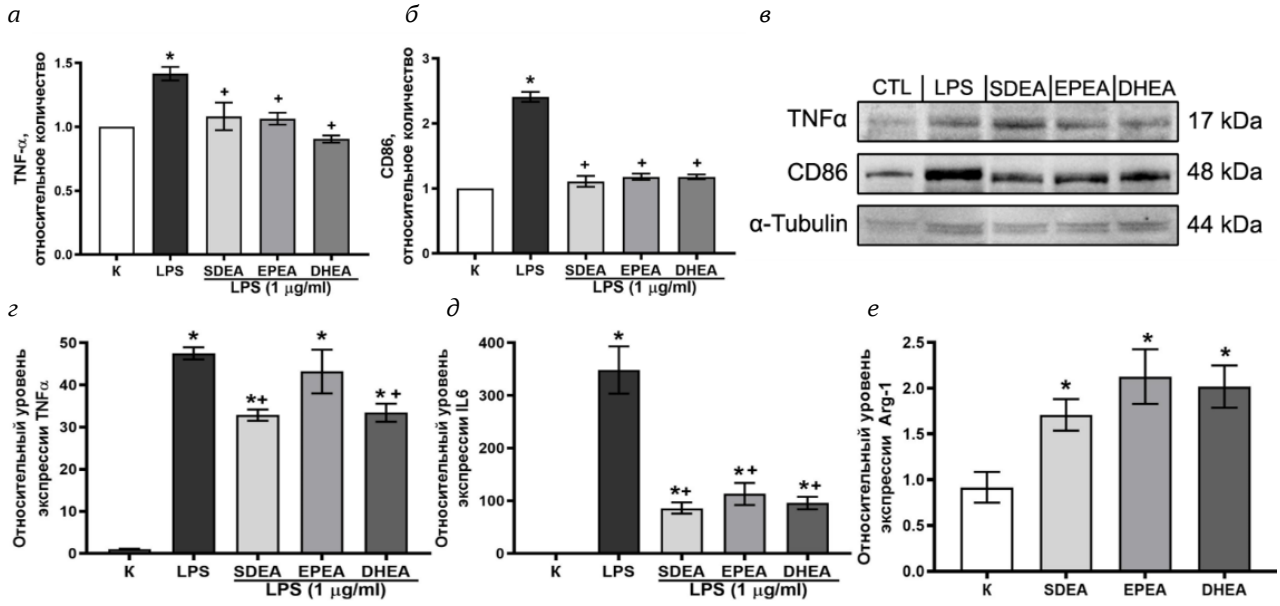


Рис. 2. Уровень синтеза TNF-α (*а*) и CD86 (*б*), данные нормализованы по α-тубулину и выражены относительно контроля. Уровень экспрессии TNF-α (*г*), IL-6 (*д*) в ЛПС-индуцированных клетках микроглии и Arg-1 (*е*) в микроглии без обработки ЛПС

Полученные данные расширяют понимание роли эндогенных липидных медиаторов при патологиях ЦНС и подчеркивают необходимость дальнейшего изучения этаноламидов омега-3 ПНЖК как перспективных средств для клинического применения в терапии нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний.

Литература

1. Steinmetz J. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 // Lancet Neurol. 2021. Vol. 23. P. 344–381.

2. Tyrtyshnaia A.A., Manzhulo I.V. Neuroinflammation and adult hippocampal neurogenesis in neuropathic pain and alkyl glycerol ethers treatment in aged mice // Int. J. Mol. Med. 2019. Vol. 43. P. 2153–2163.

3. Saini R.K., Keum R.K. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance // Life Sci. 2018. Vol. 203. P. 255–267.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-252

АССОЦИАЦИЯ ГОМОЗИГОТНОГО ВАРИАНТА С.1019G>A ГЕНА *GCK* С ФЕНОТИПОМ MODY*

ASSOCIATION OF A HOMOZYGOUS *GCK* VARIANT C.1019G>A WITH THE MODY PHENOTYPE

В. Ю. Данильченко[1], Д. Е. Иванощук[1,2], С. В. Мустафина[2], А. К. Овсянникова[2], О. Д. Рымар[2], Е. В. Шахтшнейдер[1,2]

[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[2]Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

V. Yu. Danilchenko[1], D. E. Ivanoshchuk[1,2], S. V. Mustafina[2], A. K. Ovsyannikova[2], O. D. Rymar[2], E. V. Shakhtshneider[1,2]

[1]Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk
[2]Research Institute of Internal and Preventive Medicine — branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ danilchenko_valeri@mail.ru

Аннотация

Исследован редкий случай развития сахарного диабета взрослого типа у молодых (MODY), обусловленный гомозиготным вариантом в гене *GCK*. У пробанда, ее матери и несовершеннолетней дочери пробанда методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру выявлена замена c.1019G>A (NM_000162.5) в 8-м экзоне гена *GCK*. Функциональный анализ с использованием системы мини-генов предложен для оценки влияния обнаруженного варианта.

Abstract

A rare case of maturity-onset diabetes of the young (MODY) caused by a homozygous variant in the *GCK* gene was investigated. In the proband, her mother, and the proband's minor daughter, direct automated Sanger sequencing revealed a c.1019G>A (NM_000162.5) substitution in exon 8 of the *GCK* gene. Functional analysis using a minigene system was proposed to assess the impact of the identified variant.

Ген *GCK* кодирует глюкокиназу (гексокиназу 4) — ключевой фермент метаболизма глюкозы, обеспечивающий поддержание ее концентрации в крови в пределах физиологической нормы [1]. MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) — это форма сахарного диабета с аутосомно-доминантным типом наследования, возникающая в молодом возрасте и обусловленная дисфункцией β-клеток поджелудочной железы. На сегодняшний день описано 14 подтипов MODY, из которых подтип, связанный с вариантами в гене *GCK* (MODY2), составляет до 60 % всех случаев MODY [2]. MODY2 характеризуется умеренным повышением уровня глюкозы натощак, хорошим ответом на медикаментозную терапию и низкой частотой развития микро- и макрососудистых осложнений. Гомозиготные и компаунд-гетерозиготные варианты в гене *GCK* ассоциированы с неонатальным сахарным диабетом [3], однако описаны единичные случаи носительства гомозиготных вариантов у пациентов с умеренной гипергликемией [4, 5]. В настоящее время описано более 700 мутаций в гене *GCK*, распределенных по всей его длине, однако функциональная характеристика *in vitro* проведена менее чем для 100 из них [6, 7]. Таким образом, функциональная значимость большинства вариантов в гене *GCK* остается недостаточно изученной.

В настоящем исследовании представлен редкий случай гомозиготной формы MODY у женщины. С учетом семейного анамнеза сахарного диабета (у матери пробанда), сохранности уровня С-пептида, отсутствия антител к островковым клеткам поджелудочной железы и нормального индекса массы тела был заподозрен MODY-диабет. Секвенирование экзонов и прилегающих интронных областей гена *GCK* методом Сэнгера проведено у пробанда и доступных членов семьи: матери (с клиникой MODY2) и дочери (3 года, нормогликемия на момент обследования). У всех трех выявлен вариант c.1019G>A (NM_000162.5) в 8-м экзоне гена *GCK*. При этом мать пробанда является гетерозиготным носителем варианта, а пробанд и ее дочь — гомозиготными носителями (отец пробанда и супруг на момент исследования были недоступны для анализа). Экзоны 6–8 кодируют аминокислотные остат-

* Сбор образцов и секвенирование выполнены в рамках бюджетного проекта FWNR-2022-0021, работа с клеточными линиями выполнена в рамках проекта FWNR-2022-0015.

© В. Ю. Данильченко, Д. Е. Иванощук, С. В. Мустафина, А. К. Овсянникова, О. Д. Рымар, Е. В. Шахтшнейдер, 2025

ки, критически важные для формирования активного центра фермента [7]. Вариант c.1019G>A (NM_000162.5) описан у пациентов с MODY [8, 9] и локализуется в последнем нуклеотиде экзона 8, что может приводить к нарушению консенсусного сайта сплайсинга. В популяционной базе данных gnomAD (v3.1.2) данный вариант не зарегистрирован. Для оценки влияния варианта c.1019G>A (NM_000162.5) на процесс сплайсинга будет использован метод с использованием мини-генов по ранее опубликованной методике [10], что позволит провести сравнительный анализ паттернов сплайсинга при наличии мутантного варианта и аллеля дикого типа. Представленный случай подчеркивает важность проведения генетического анализа у пациентов с ранним началом сахарного диабета и отягощенным семейным анамнезом. Использование системы мини-генов является надежным инструментом для изучения влияния генетических вариантов на сплайсинг, особенно в тех случаях, когда получение РНК-материала от пациентов невозможно.

Литература

1. Iynedjian P. B. Molecular physiology of mammalian glucokinase // Cell Mol Life Sci. 2009. Vol. 66. P. 27–42.

2. Bishay R. H., Greenfield J. R. A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY // Med. J. Aust. 2016. Vol. 21, No. 205 (10). P. 480–485.

3. Njølstad P. R., Søvik O., Cuesta-Muñoz A. et al. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 24, No. 344 (21). P. 1588–92.

4. Raimondo A., Chakera A. J., Thomsen S. K. et al. Phenotypic severity of homozygous GCK mutations causing neonatal or childhood-onset diabetes is primarily mediated through effects on protein stability // Hum Mol. Genet. 2014. Vol. 23, No. 24. P. 6432–40.

5. Marucci A., Biagini T., Di Paola R. et al. Association of a homozygous GCK missense mutation with mild diabetes // Mol. Genet. Genomic. Med. 2019. Vol. 7 (7). P. e00728.

6. Marucci A., Rutigliano I., Fini G. et al. Role of Actionable Genes in Pursuing a True Approach of Precision Medicine in Monogenic Diabetes // Genes (Basel). 2022. Vol. 13 (1). P. 117.

7. Abu Aqel Y., Alnesf A., Aigha I. I. et al. Glucokinase (GCK) in diabetes: from molecular mechanisms to disease pathogenesi // Cell Mol. Biol. Lett. 2024. Vol. 8. 29 (1). P. 120.

8. Delvecchio M., Mozzillo E., Salzano G. et al. Monogenic Diabetes Accounts for 6.3 % of Cases Referred to 15 Italian Pediatric Diabetes Centers During 2007 to 2012 // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2017. Vol. 102, No. 6. P. 1826–1834.

9. Breidbart E., Deng L., Lanzano P. et al. Frequency and characterization of mutations in genes in a large cohort of patients referred to MODY registry // J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 2021. Vol. 34, No. 5. P. 633–638.

10. Panina E. A., Danilchenko V. Y., Zytsar M. V. et al. Analysis by Minigene Assay of the Splicing Effect of a Novel Variant c.1545T>G in the SLC26A4 Gene Associated with Hearing Loss // Russ J Genet. 2025. Vol. 61. P. 602–607.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-253

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ БЕТА-ЦЕПЕЙ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И BULK-RNA-TCR-СЕКВЕНИРОВАНИЯ*

QUANTIFICATION OF T-CELL RECEPTOR BETA CHAIN DIVERSITY IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS USING SPECTRAL FLOW CYTOMETRY AND BULK RNA-TCR SEQUENCING

А. Е. Егорова[1], Е. А. Астахова[1,2], Я. С. Киселева[1,2], З. Г. Антышева[1,2], А. А. Степанова[1,2], А. Д. Акино[3], А. С. Головкин[3], Д. В. Табаков[1,2], П. Ю. Волчков[1,2]

[1]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный
[2]Федеральный исследовательский центр инновационных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва
[3]Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

A. E. Egorova[1], E. A. Astakhova[1,2], Y. S. Kiseleva[1,2], Z. G. Antysheva[1,2], A. A. Stepanova[1,2], A. D. Aquino[3], A. S. Golovkin[3], D. V. Tabakov[1,2], P. Yu. Volchkov[1,2]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
[2]Federal Research Center for Innovative and Advanced Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow
[3]Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg

✉ egorova.ae@genlab.llc

Аннотация

На сегодняшний день исследование репертуаров Т-лимфоцитов (TCR) и поиск клонов, ассоциированных с тем или иным заболеванием, является актуальной задачей для иммунодиагностики. В работе валидирована специфичность антител к TCR (7/10 специфичны на ~ 100 %). Также была проведена сравнительная характеристика методов анализа TCR: NGS-секвенирования, например bulk-RNA-TCR-seq, и спектральной цитометрии, выявлена слабая корреляция (r = 0,5).

Abstract

Today, the study of T-lymphocyte repertoires (TCR) and the search for clones associated with a particular disease is a topical task for immunodiagnostics. The work validated the specificity of antibodies to TCR (7/10 are specific by ~ 100 %). A comparative characteristic of TCR analysis methods was also carried out: NGS sequencing, for example, bulk-RNA-TCR-seq, and spectral cytometry, a weak correlation was revealed (r = 0.5).

В исследовании приняли участие 5 условно здоровых добровольцев, от которых были получены образцы периферической венозной крови объемом 20 мл в вакутейнерах с антикоагулянтом. Мононуклеары периферической крови (PBMC) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла. Образцы PBMC были окрашены антителами CD3-PerCP (клон OKT-3, Elabscience) и антителами к бета-цепям TCR (см. таблицу).

Панель моноклональных антител к TCR Vβ, используемая в исследовании

Наименование антитела TCR VβX и флуоресцентная метка	Клон антитела	IMGT наименование генов антител
Vβ1-VioBlue	REA662	TRBV9, 1
Vβ2-PerCP-Vio700	REA654	TRBV20, 2
Vβ5.1-PE-Vio615	REA1062	TRBV5-1
Vβ7.1-PE-Vio770	REA871	TRBV4, 7
Vβ11-PE	REA559	TRBV25
Vβ13.6-APC	REA554	TRBV6-6
Vβ16-VioBrightV423	REA553	TRBV14
Vβ17-VioBrightR720	REA915	TRBV17, 19
Vβ21.3-FITC	REA894	TRBV11-2
Vβ23-APC-Vio770	REA497	TRBV13, 23-1

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-03-2025-662).

© А. Е. Егорова, Е. А. Астахова, Я. С. Киселева, З. Г. Антышева, А. А. Степанова, А. Д. Акино, А. С. Головкин, Д. В. Табаков, П. Ю. Волчков, 2025

Сортировку CD3⁺-клеток из PBMC, экспрессирующих один из TCRов, представленных в панели, проводили на спектральном проточном сортере Cytek Aurora CS. Отсортированные клетки (от 50 тыс. до 2 млн) лизировали в RLT буфере (Qiagen) и хранили при −80 °C до момента выделения РНК стандартным методом с использованием TRIzol. Библиотеки нарабатывали набором MULTIPLEX RNA TCRαβ KIT HUMAN (MiLaboratory). Секвенирование образцов проводили на приборе Illumina MiSeq v2. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения MiXCR (рис. 1).

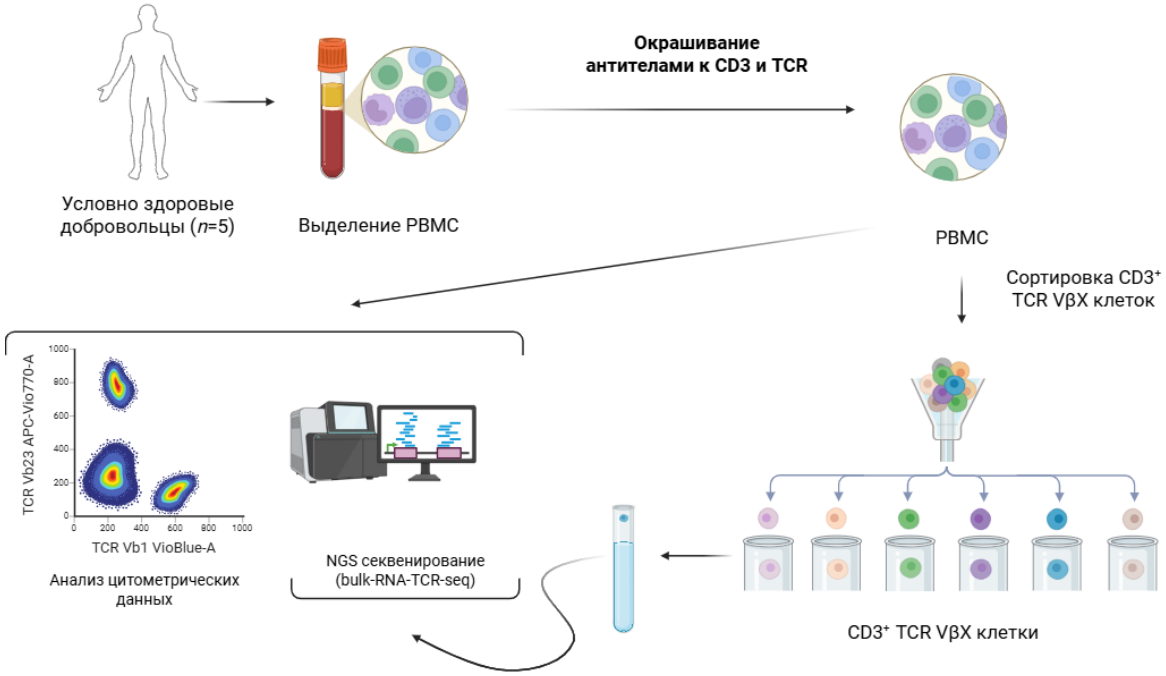


Рис. 1. Дизайн исследования

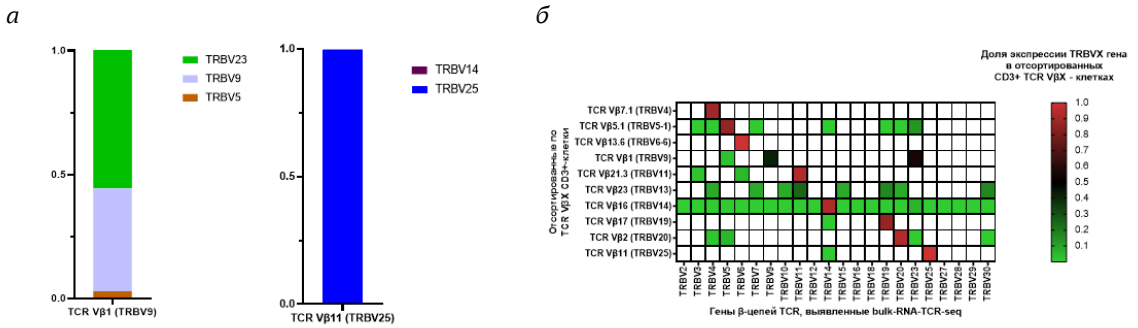


Рис. 2. Оценка специфичности антител к бета-цепям TCR: *а* — пример экспрессии TRBVX генов в отсортированных CD3⁺ TCR VβX-клетках; *б* — тепловая карта, показывающая долю экспрессии бета-цепей TCR в популяции CD3⁺-клеток, отсортированных по каждому из TCR VβX

С помощью NGS-секвенирования была оценена специфичность антител к различным бета-цепям TCR в отсортированных CD3⁺ TCR VβX клетках. Бета-цепи TCR соответствовали заявленным мишеням коммерческих антител к TCR Vβ2, Vβ7.1, Vβ11, Vβ13.6, Vβ16, Vβ17, Vβ21.3 на 0,9–1 долю по уровню экспрессии, т. е. специфичность антител к этим цепям оказалась достаточно высокой (рис. 2). Антитела к Vβ1, Vβ5.1 оказались менее специфичными. Бета-цепь TCR, полученная из CD3⁺-клеток, отсортированных по TCR Vβ23, не совпадала с заявленной (ген TRBV13 не экспрессировался). Ген TRBV23 является псевдогеном, однако именно его последовательности составили наибольшую долю в пуле прочтений, полученных из клеток, отсортированных по TCR Vβ1, создавая ложное впечатление его высокой экспрессии. Полученный результат требует дальнейшего изучения.

На следующем этапе был проведен сравнительный анализ репертуара бета-цепей TCR в периферической крови пяти добровольцев (рис. 3). Цитометрические данные с 2 млн PBMC получали параллельно процессу сортировки. Последовательности бета-цепей из PBMC секвенировали. Для каждого добровольца был определен коэффициент корреляции Спирмена между содержанием бета-цепей в общем пуле, полученным двумя методами. Среднее значение коэффициента корреляции, рассчитанное по данным от 5 добровольцев, составило 0,5, что говорит о среднем уровне соответствия полученных результатов.

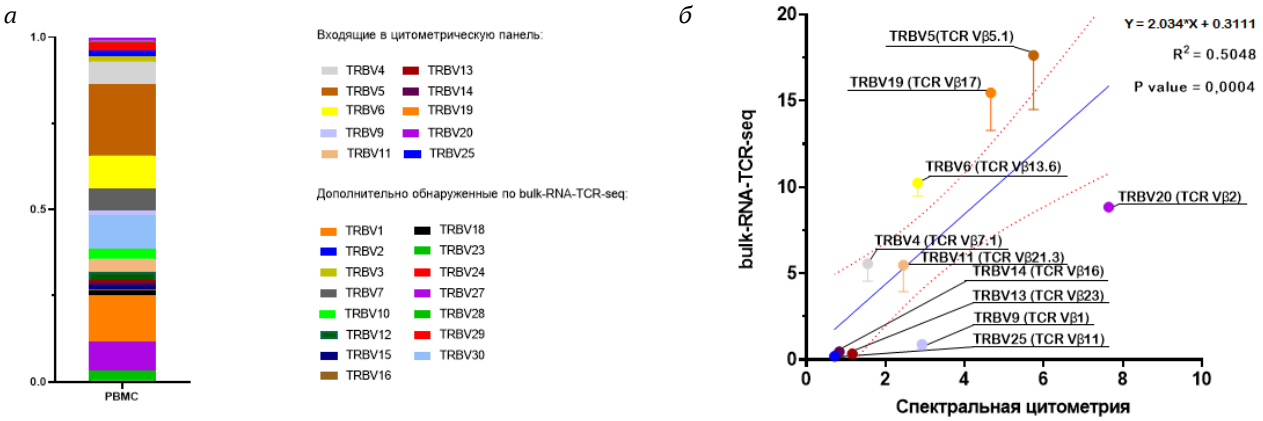


Рис. 3. Количественная оценка репертуара бета-цепей TCR в PBMC: *а* — пример экспрессии TRBV генов в PBMC; *б* — корреляция данных, полученных с помощью bulk-RNA-TCRseq и спектральной цитометрии

Таким образом, подходы по определению специфичности антител к бета-цепям TCR и полученные результаты могут быть полезны для индустрии производства моноклональных антител к сложным антигенам, а также для изучения структурных различий в бета-цепях TCR. В работе мы показали, что результаты, получаемые с помощью NGS-секвенирования и проточной цитометрии, имеют низкую корреляцию, что подчеркивает важность валидации данных секвенирования функциональными тестами.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-254

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА GLP-1R НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ *IN VITRO* ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ПРЕПАРАТОМ ТИРЗЕПАТИД В ТЕСТЕ «КАЛЬЦИЕВЫЕ ТОКИ»

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ASSESSING GLP-1R RECEPTOR ON A CELL LINE *IN VITRO* UPON STIMULATION WITH TIRZEPATIDE IN THE "CALCIUM FLUX" ASSAY

Д. О. Ермолаева, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, А. С. Гончарова, Т. А. Сельменских

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

D. O. Ermolaeva, V. B. Saparova, A. N. Afanaseva, A. S. Goncharova, T. A. Selmenskikh

Pharm Holding CJSC, Saint Petersburg

✉ Daria.Ermolaeva@geropharm.com

Аннотация

Для проведения исследований сопоставимости биоэквивалентных лекарственных препаратов тирзепатид была разработана методика оценки активации рецептора GLP-1R в тесте «кальциевые токи». Нами был использован *in vitro* метод определения активации рецептора и регистрации тока кальция с помощью зеленого флуоресцентного кальций связывающего красителя Fluo-8 AM.

Abstract

To conduct comparability studies of bioequivalent tirzepatide drugs, a method for assessing GLP-1R receptor activation in the Calcium Flux assay was developed. We used an *in vitro* method for determining receptor activation and recording calcium flux using the green fluorescent calcium-binding dye Fluo-8 AM.

Тирзепатид — инновационный препарат, являющийся агонистом как глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), так и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP). GIP и GLP-1 являются инкретиновыми гормонами: они высвобождаются в кишечнике в ответ на потребление питательных веществ и стимулируют активность β-клеток поджелудочной железы, секретирующих инсулин, тем самым участвуя в регуляции гомеостаза глюкозы [1].

В методике оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатид в тесте «кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R в качестве тест-системы использована клеточная линия HTS163L (Eurofins, Франция) с экспрессией человеческого рецептора GLP-1. Наличие рецептора на поверхности клеточной мембраны позволяет осуществляться биологическому эффекту GLP-1 и его аналогов, выражающемуся в повышении внутриклеточного уровня цАМФ, запуску кальциевого сигналинга и росту концентрации кальция в клетке.

Клеточную линию культивировали согласно инструкции производителя. Рассев производили в черные 96-луночные планшеты по 5 000 клеток на лунку в питательной среде. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5 % CO_2 24 ± 4 ч. На следующий день к клеткам вносили буфер, содержащий 2 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-8 AM, инкубировали 30 мин, защищая от света. Готовили разведения препаратов в финальных концентрациях от 500 до 2 000 000 пМ. В качестве отрицательного контроля выступали лунки с клетками в буфере, не содержащем флуоресцентного красителя, к которым не добавляли препарат. После внесения препаратов проводили снятие флуоресцентного сигнала на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 520 нм.

Анализ данных проводили в программе MARS (BMG Labtech, Германия) по методу параллельных кривых с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL) и доверительного интервала 95 %. В рамках разработки методики был подобран диапазон концентраций тирзепатида, позволяющий наблюдать нижнее и верхнее плато на кривых доза-эффект, а также обеспечивающий коэффициент детерминации $R^2 > 0{,}9$. График зависимости RFU (относительных единиц флуоресценции) относительно концентрации тирзепатида представлен на рисунке.

Анализ данных продемонстрировал, что разработанная методика позволяет выявлять индуцируемое тирзепатидом увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Величина ответа препарата в максимальной концентрации составила от 47 до 76 % относительно сигнала, наблюдаемого в отрицательном контроле.

© Д. О. Ермолаева, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, А. С. Гончарова, Т. А. Сельменских, 2025

Значение коэффициента детерминации R^2 составило 0,944. Таким образом, разработанная методика позволяет оценить активацию рецептора GLP-1R на клеточной линии *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид.

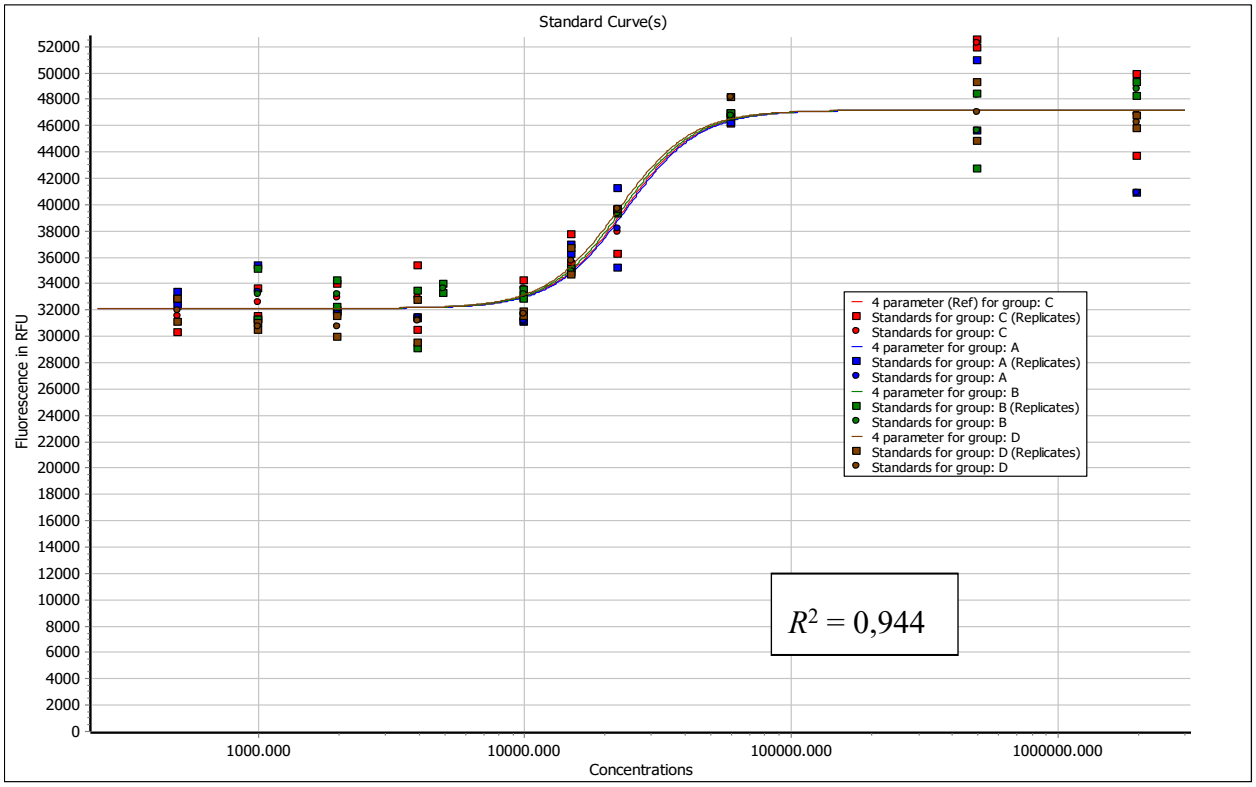


График зависимости RFU от концентрации

Литература

1. Forzano I., Varzideh F., Avvisato R. et al. Tirzepatide: A Systematic Update // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 23. URL: https://www.mdpi.com/1422-0067/23/23/14631 (accessed: 01.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-255

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА GLP-1R *IN VITRO* ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ПРЕПАРАТОМ ТИРЗЕПАТИД

VALIDATION OF A METHOD FOR ASSESSING GLP-1R RECEPTOR *IN VITRO* UPON STIMULATION WITH TIRZEPATIDE

Д. О. Ермолаева, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, А. С. Гончарова, Т. А. Сельменских

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

D. O. Ermolaeva, V. B. Saparova, A. N. Afanaseva, A. S. Goncharova, T. A. Selmenskikh

Pharm Holding CJSC, Saint Petersburg

✉ Daria.Ermolaeva@geropharm.com

Аннотация

Была разработана и валидирована методика оценки активации рецептора GLP-1R тирзепатидом в тесте «Кальциевые токи» с помощью регистрации тока кальция флуоресцентным методом. Валидированная методика является специфичной, правильной, линейной, сохраняется предел количественного определения, прецизионность, определяется аналитическая область.

Abstract

A method for assessing GLP-1R receptor activation by tirzepatide in the «Calcium Flux» assay using fluorescent-based calcium current recording was developed and validated. The validated method is specific, correct, linear, the limit of quantitative determination and precision are preserved, and the analytical range is determined.

Клеточную линию HTS163L (Eurofins, Франция) с экспрессией человеческого рецептора GLP-1 культивировали согласно инструкции производителя. Рассев производили в черные 96-луночные планшеты по 5 000 клеток на лунку в питательной среде. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5 % CO_2 24 ± 4 ч. На следующий день к клеткам вносили буфер, содержащий 2 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-8 AM, инкубировали 30 мин, защищая от света. Готовили разведения препаратов в финальных концентрациях от 500 до 2 000 000 пМ. После внесения препаратов проводили снятие флуоресцентного сигнала на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 520 нм. Анализ данных проводили в программе MARS (BMG Labtech, Германия) по методу параллельных кривых с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL) и доверительного интервала 95 %.

Валидацию биоаналитической методики оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатид в тесте «Кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ, ICH и EMA. В рамках валидации были оценены следующие параметры: специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность).

Методика является специфичной, если в нижней точке концентрации сигнал образца, не содержащего анализируемого вещества (плацебо), не превышает 20 % сигнала препарата. Для оценки специфичности было проведено сравнение сигнала для плацебо Седжаро® (ЗАО «Фарм Холдинг», Россия) и препарата Мунджаро® (Eli Lilly Inc., Канада) в концентрации 500 пМ. Ответ для плацебо соответствует 2 % сигнала для исследуемого вещества, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Критерий приемлемости для предела количественного определения (ПКО) сохраняется, если сигнал анализируемого вещества из образца в нижней точке концентрации не менее чем на 20 % превышает сигнал холостого образца. ПКО оценивался при сравнении сигнала для препарата в концентрации 500 пМ и холостой пробы (лунки с клетками без Fluo-8 AM). Сигнал анализируемого вещества для препарата превосходит величину сигнала холостой пробы на 43 %.

Линейность методики подтверждалась коэффициентом детерминации $R^2 \geqslant 0{,}9$ для 4-параметрической нелинейной калибровочной модели в пределах аналитической области методики. Пропорциональность отклика препарата Мунджаро® была оценена в концентрациях от 500 до 2 000 000 пМ. Коэффициент детерминации составил 0,981, что удовлетворяет критерию приемлемости.

© Д. О. Ермолаева, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, А. С. Гончарова, Т. А. Сельменских, 2025

Для оценки правильности определяли значения EC_{50} — концентрации Мунджаро®, при которой достигается 50 % активации кальциевых токов — на четырех уровнях разведений: 175; 100; 50 и 25 % от номинальной концентрации. Правильность характеризуется показателем открываемость и должна находиться в диапазоне 100 ± 25 % от номинального значения. Правильность методики находится в диапазоне от 77 до 119 %, что согласуется с критерием приемлемости.

Прецизионность оценивали по результатам повторных измерений, выполненных одним исполнителем в один день (сходимость) и по трем циклам повторных измерений, выполненных разными исполнителями в разные дни (внутрилабораторная прецизионность). Разброс оценивали с помощью коэффициента вариации CV, его значение должно быть ⩽ 20 % для нижней точки концентрации и ⩽ 15 % для остальных концентраций. Результаты по параметру сходимость находятся в диапазоне от 3 до 5 %, по параметру внутрилабораторная прецизионность — в диапазоне от 4 до 9 %, что соответствует критериям приемлемости.

Для диапазона концентраций Мунджаро® от 500 до 2 000 000 пМ определена прецизионность, линейность и правильность, которые удовлетворяют критериям приемлемости. Таким образом, аналитическая область методики установлена на уровне от 500 до 2 000 000 пМ.

По итогам проведенной валидации биоаналитическая методика оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатид в тесте «Кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R является специфичной, линейной, правильной и высокопрецизионной, сохраняется предел количественного определения, определяется аналитическая область, что делает методику пригодной для применения в доклинических исследованиях биоэквивалентных и аналогичных препаратов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-256

РЕАЛИЗАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА ПРИ ТРАНСОВАРИАЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ У КУР

REALIZATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NICOTINAMIDADENYNDINUCLEOTIDE IN TRANSVARIAL USE IN CHICKENS

К. А. Ерхова, Т. О. Азарнова, Т. В. Монстакова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина

K. A. Erhova, T. O. Azarnova, T. V. Monstakova

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Skryabin

✉ kseniyaerhova@bk.ru

Аннотация

В работе представлены результаты исследования эффективности трансовариального однократного использования никотинамиладениндинуклеотида с целью коррегирования интенсивности липопероксидации у эмбрионов кур для повышения качества и жизнеспособности молодняка кур в раннем онтогенезе.

Abstract

The paper presents the results of a study on the effectiveness of a single transovarial administration of nicotinamide adenine dinucleotide to correct the intensity of lipoperoxidation in chicken embryos in order to improve the quality and viability of young chickens during early ontogenesis.

Введение

Эмбрионы с/х птицы на разных этапах своего развития подвергаются воздействию различных факторов стресса, сопряженных с условиями искусственной инкубации, что приводит к избыточному синтезу свободных радикалов и, как следствие, продуктов липопероксидации [1, 2]. В первую очередь это влечет за собой нарушение не только целостности мембранных структур, но и всех составляющих клетки, а вместе с тем функциональности тканей, органов, организма в целом [3, 4]. В связи с этим не вызывает сомнений актуальность поиска и детального изучения новых высокоэффективных биостимуляторов с выраженными многоплановыми антиоксидантными свойствами.

Как известно, антиоксидантные действия никатинамидадениндинуклеотида могут реализовываться через трансформацию в никатинамидадениндинуклеотидфосфат и восстановление последнего с последующим переносом протонов водорода для восполнения «защитников» от стресса [5].

Цель работы — изучить эффективность проявления антиоксидантного действия никатинамидадениндинуклеотида у эмбрионов кур при однократном трансовариальном использовании.

Объекты и методы исследования

Эксперимент осуществили в Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина на базе кафедры химии им. профессоров С. И. Афонского, А. Г. Малахова с использованием инкубационного яйца от кур яичного направления продуктивности кросса «Хайсекс Браун», которые подбирали по 100 штук в партии по принципу аналогов: с учетом времени снесения, сроков хранения и массы. Опытные партии обрабатывали однократно трансовариально растворами биостимулятора (никотинамиладениндинуклеотид) перед инкубацией в диапазоне концентраций, допустимых для предынкубационного введения, рекомендованных И. И. Кочишом и М. С. Найденским (2019 г.) [1]. Все исследования осуществляли по общепринятым методикам [6–8].

Результаты и обсуждение

Предынкубационная обработка яиц водными растворами никотинамиладениндинуклеотида оказала корригирующее влияние на свободнорадикальные процессы и липопероксидацию у молодняка опытных групп в широком диапазоне концентраций.

Так, в плазме крови цыплят суточного возраста в опытных группах зафиксировано достоверное снижение концентрации каскада продуктов перекисного окисления липидов: липидов с изолированными двойными свя-

© К. А. Ерхова, Т. О. Азарнова, Т. В. Монстакова, 2025

зями в 1-й опытной группе — на 18,0 % ($p < 0,001$), в 2-й — на 25,5 % ($p < 0,001$), в 3-й — в 1,7 раза ($p < 0,001$) и 4-й — в 1,5 раза ($p < 0,001$), тогда как триеновых конъюгатов — на 28,1 % ($p < 0,01$), на 16,6 %, в 1,2 раза ($p < 0,01$), на 21,9 % ($p < 0,05$); оксодиеновых конъюгатов — на 2,17; 2,2; 15,2 % ($p < 0,05$) и 7,6 %; оснований Шиффа — на 1,3; 3,8; 12,5; 11,3 % соответственно. Заявленное, очевидно, сопряжено с возможностью восстановленного никатиамидадениндинуктеотитфосфата восполнять антиоксиданты и (или) непосредственно препятствовать модификации отдельных фрагментов мембран [9], а вместе с тем препятствовать избыточной липопероксидации на всех этапах процесса [10]. Следует отметить, что снижение избыточной интенсивности этого процесса сопровождалось достоверным увеличением общей антиоксидантной активности в 1-й опытной группе на 13,0 % ($p < 0,001$), в 2-й — в 1,4 раза ($p < 0,001$), в 3-й — в 1,4 раза ($p < 0,001$) и в 4-й — на 16,2 % ($p < 0,001$) соответственно, по сравнению с контролем. Зафиксированное свидетельствует о том, что никотинамидадениндинуклеотид обладает широким диапазоном антиоксидантного действия в организме эмбрионов кур.

Реализация его этих свойств и, очевидно, общеизвестные аспекты участия в различных обменных процессах никатинамидадениндинуклеотида определили условия для получения более качественного и высоко жизнеспособного молодняка, что выразилось в увеличении бальной оценки по шкале «Оптистарт+» относительно контроля: в 1-й группе — на 1,1 ($p < 0,01$), в 2-й — на 1,0 ($p < 0,05$), в 3-й — на 1,2 ($p < 0,01$) и в 4-й — на 0,7 балла соответственно, а также выводимости яиц и вывода цыплят в 1-й группе — на 9,2 и 9,2 %, в 2-й группе — на 5,3 и 5,3 %, в 3-й — на 10,7 и 11,84 %, в 4-й — на 4,8 и 2,6 %.

Выводы

Таким образом, никотинамиладениндинуклеотид действительно имеет возможности к реализации антиоксидантных действий в широком диапазоне концентраций в организме эмбрионов кур, что в совокупности с участием в различных метаболических процессах обусловило увеличение качества молодняка и повышение его жизнеспособности в раннем онтогенезе.

Литература

1. Кочиш И. И., Азарнова Т. О., Найденский М. С. Профилактика свободнорадикальных аномалий у кур в раннем онтогенезе. М.: Сельскохоз. технологии, 2019. С. 358.

2. Кочиш И. И., Луговая И. С., Азарнова Т. О. и др. Повышение стрессоустойчивости молодняка кур яичного кросса при использовании биологически активных веществ перед инкубацией // Докл. РАН. Науки о жизни. 2020. № 1. С. 491–495.

3. Азарнова Т. О., Бобылькова А. Е., Ярцева И. С. Профилактика окислительного стресса, как способ пвышения естественной резистентности цыплят // Ветеринария и кормление. 2013. № 1. С. 34–35.

4. Тагиров М. Т., Терещенко А. В. Питание и основные метаболические пути в развивающемся зародыше птицы // Вестн. Харьков. нац. ун-та им. Каразина. Сер. «Биология». 2009. № 878. С. 30–35.

5. Liu L., Su X., Quinn W. J. et al. Quantitative analysis of NAD synthesis-breakdown fluxes // Cell Metab. 2018. P. 1067–1080.

6. Александрова Т. С. Совершенствование оценки и технологических приемов выращивания цыплят-бройлеров: дис. … канд. биол. наук: 06.02.05, 03.01.04 // Ставроп. гос. аграр. ун-т. Ставрополь, 2014. С. 23.

7. Бессарабов Б. Ф., Крыканов А. А., Киселев А. Л. Инкубация яиц сельскохозяйственной птицы: учеб. пособие для СПО. СПб.: Лань, 2021. С. 160.

8. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справ. изд. М.: КолосС, 2004. С. 520.

9. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия / пер. с англ. Т. П. Мосоловой. М.: Лаоратория знаний, 2019. С. 509.

10. Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012. № 2. С. 178–180.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-257

ИНДИВИДУАЛИЗАЦИЯ СЕСТРИНСКИХ ХРОМАТИД В ИНТЕРФАЗЕ НА ФОНЕ НОКАУТА КОГЕЗИНА *

INDIVIDUALIZATION OF SISTER CHROMATIDS DURING INTERPHASE UNDER COHESIN KNOCKOUT CONDITIONS

Е. П. Казаков, И. И. Киреев

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E. P. Kazakov, I. I. Kireev

Lomonosov Moscow State University

✉ kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

Аннотация

На модели индуцибельного нокаута Rad21 с применением методов машинного обучения и субдифракционной микроскопии нами был разработан подход к классификации ядер клеток по фазам репликации и анализу структуры репликативных доменов. Данный подход позволил охарактеризовать пострепликативную реорганизацию хроматина с разным эпигенетическим статусом и роль когезинового комплекса в этом процессе.

Abstract

Using machine learning and subdiffraction microscopy, we developed an inspired by the Rad21-induced knockout model approach to classify cell nuclei by replication phase and analyze replicative domain structure. This approach characterized the post-replication reorganization of chromatin across different epigenetic states and defined the role of the cohesin complex in this process.

Архитектурные белки хроматина играют важную роль в организации и обеспечении функций генома [1]. Они поддерживают целостность генома, регулируют процессы репликации и транскрипции. Основными архитектурными комплексами являются когезин и конденсины I и II. Они упорядочивают петли хроматина в интерфазе (когезины) и в ходе митотической компактизации (конденсины). Формирование петель хроматина играет структурную роль в формировании ТАДов и функциональную в обеспечении взаимодействий энхансеров и промоторов для запуска транскрипции. Также когезин регулирует сегрегацию генома, удерживая сестринские хроматиды вместе, начиная с их формирования в S-фазе, вплоть до разделения их в анафазе. Индивидуализация хроматид на уровне отдельных генных локусов начинается в G2-фазе клеточного цикла [2], но не сопровождается значительным утолщением хроматиновых фибрилл [3]. В G2-фазе клеточного цикла есть две фракции когезина [4]. Первая связана с белком сорорином и обеспечивает непосредственно когезию хроматид, формируемых в ходе репликации. Вторая более мобильна и участвует в обособлении хроматид. Это ставит перед нами вопросы о том, как когезин обеспечивает премитотическую сегрегацию хроматид и какова роль их ранней индивидуализации. Целью исследования является анализ изменений, происходящих в структуре пострепликативного хроматина при дисфункции когезина.

В качестве объекта исследования мы использовали клеточные линии Hap1 и HCT116 с ауксиновым дегроном Rad21 для моделирования нокаута когезина. Визуализацию репликативных доменов проводили с помощью EdU и последующей микроскопии структурированного освещения (SIM). Такой подход, с одной стороны, позволяет получать высокое разрешение, а с другой — имеет достаточную производительность. Затем мы проводили измерение различных параметров, характеризующих распределение репликативной метки в ядре, необходимых для дальнейшего машинного обучения. Измерение проводилось при помощи ПО CellProfiler. Были проведены измерения интенсивности и характеристик пространственного распределения флуоресценции репликативного сигнала, таких как гранулярность, текстура и др. Мы провели классификацию ядер по паттернам репликации на основе параметров, полученных из CellProfiler. Классификация проводилась с помощью алгоритма случайного леса. Предварительный анализ показал, что нокаут Rad21 приводит к декомпактизации репликативных фокусов и распределению репликативного сигнала вдоль хроматиновых фибрилл спустя некоторое время после репли-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Некоммерческого фонда развития науки и образования «Интеллект».

© Е. П. Казаков, И. И. Киреев, 2025

кативного мечения, что свидетельствует о значительной перестройке хроматиновых структур без значительного утолщения фибрилл.

Литература

1. Hoencamp C., Rowland B. D. Genome control by SMC complexes // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2023. Vol. 34. P. 633–650.

2. Stanyte R., Nuebler J., Blaukopf C. et al. Dynamics of sister chromatid resolution during cell cycle progression // J. Cell Biology. 2018. Vol. 217. P. 1985–2004.

3. Deng X., Zhironkina O. A., Cherepanytes V. D. et al. Cytology of DNA replication reveals dynamic plasticity of large-scale chromatin fibers // Curr. Biol. 2016. Vol. 26. P. 2527–2534.

4. Batty P., Langer C. C., Takacs Z. et al. Cohesin-mediated DNA loop extrusion resolves sister chromatids in G2 phase // The EMBO J. 2023. Vol. 42. e113475.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-258

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА У ДЕТЕЙ: АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ MTHFR, MTR, MTRR *

GENETIC VARIATIONS OF THE FOLATE CYCLE AND THEIR ROLE IN THE DEVELOPMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS IN CHILDREN: ANALYSIS OF MTHFR, MTR, AND MTRR POLYMORPHISMS

А. Д. Козлова[1], Н. А. Смолко[1,2], Я. О. Мухамедшина[1,2], Д. Р. Камальдинова[1], И. М. Кабдеш[1], Р. А. Файзуллина[2]

[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2]Казанский государственный медицинский университет

A. D. Kozlova[1], N. A. Smolko[1,2], Ya. O. Mukhamedshina[1,2], D. R. Kamaldinova[1], I. M. Kabdesh[1], R. A. Faizullina[2]

[1]Kazan Federal University
[2]Kazan State Medical University

✉ nastia7.08.2002@mail.ru

Аннотация

В работе исследуется ассоциация полиморфизмов генов фолатного цикла (MTHFR, MTR, MTRR) с развитием РАС у детей. Генотипирование 72 человек с РАС и 22 здоровых не выявило значимых различий в частотах аллелей и их комбинаций. Результаты не подтвердили предполагаемой ассоциации, расходясь с данными некоторых предыдущих работ. Это указывает на необходимость дальнейшего изучения роли фолатного цикла в развитии аутизма.

Abstract

This study investigates the association between folate cycle gene polymorphisms (MTHFR, MTR, MTRR) and ASD in children. Genotyping analysis of 72 ASD cases and 22 healthy controls showed no significant differences in allele frequencies or their combinations. The results did not confirm the expected association, contradicting some previous studies. These results suggest the need for further investigation into folate metabolism's role in ASD etiology.

Фолатный цикл представляет собой ключевой метаболический путь, обеспечивающий нормальное развитие и функционирование нервной системы. Нарушения в работе генов фолатного цикла вызывают накопление веществ, которые оказывают нейротоксичное действие и могут приводить к таким нарушениям, как дефекты нервной трубки, нейродегенеративные заболевания и психические расстройства. В частности, фолаты необходимы для реметилирования гомоцистеина в метионин. Их дефицит может стать причиной повышенного уровня гомоцистеина, который является нейротоксичным и связан с повреждением ДНК, окислительным стрессом и нейрональным апоптозом [1].

Ряд исследований показывает, что нарушения в обмене фолатов могут способствовать развитию аутизма. Некоторые работы также указывают на связь между дефицитом фолиевой кислоты и повышенным риском расстройств аутистического спектра (РАС), а также на возможные улучшения при ее применении. MTHFR, MTR, MTRR — основные гены фолатного цикла, полиморфизмы которых чаще всего исследуются на наличие ассоциаций с различными состояниями, в том числе с РАС [2]. В связи с чем цель нашей работы — оценить влияние однонуклеотидных полиморфизмов в генах фолатного цикла (MTHFR, MTR, MTRR) на развитие РАС у детей.

Группа опыта включала 72 человека возрастом от 3 до 9 лет с диагнозом «расстройство аутического спектра» в МКБ-10 — F84.0. Исследование проводилось на базе специального (коррекционного) детского сада КФУ для детей с РАС «Мы вместе». Группа контроля состояла из 22 здоровых детей возрастом от 3 до 9 лет.

Генотипирование участников проводили методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) с помощью набора реагентов ООО НПФ «Литех», «Комплекс Фолаты». Среди участников было исследовано наличие следующих полиморфизмов: MTR (rs1805087); MTHFR (rs1801131), (rs1801133); MTRR (rs1801394).

Для выявления значимых отличий частот встречаемости вариантов генотипов в группах сравнения (дети с аутизмом / здоровые дети) был применен точный тест Фишера.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Казанского (Приволжского) федерального университета (проект № FZSM-2023-0013).

© А. Д. Козлова, Н. А. Смолко, Я. О. Мухамедшина, Д. Р. Камальдинова, И. М. Кабдеш, Р. А. Файзуллина, 2025

Сравнение частот встречаемости полиморфизмов в каждом отдельном гене среди опытной и контрольной групп не показало значимых отличий. Анализ частот встречаемости комбинаций из 4 исследуемых полиморфизмов также не выявил значимых ассоциации с развитием РАС.

Полученные данные не подтверждают ассоциации полиморфизмов генов MTHFR, MTR и MTRR с риском РАС, что противоречит результатам некоторых предыдущих исследований. Выявленные расхождения подчеркивают необходимость дальнейшего изучения роли фолатного цикла в этиологии аутизма с привлечением более крупных выборок и комплексным анализом генетических и эпигенетических факторов.

Литература

1. Hoxha B., Hoxha M., Domi E., Gervasoni J., Persichilli S., Malaj V., Zappacosta B. Folic Acid and Autism: A Systematic Review of the Current State of Knowledge // Cells. 2021. Vol. 10 (8). P. 1976.

2. Balashova O.A., Visina O., Borodinsky L.N. Folate action in nervous system development and disease // Dev. Neurobiol. 2018. Vol. 78 (4). P. 391–402.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-259

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА *TRIM14* ЧЕЛОВЕКА НА ПОВЕДЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *TRIM* В МОЗГЕ В УСЛОВИЯХ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОГО НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ*

EFFECTS OF HUMAN *TRIM14* OVEREXPRESSION ON THE BEHAVIOR OF TRANSGENIC MICE AND *TRIM* FAMILY GENE EXPRESSION IN THE MURINE BRAIN DURING LPS-INDUCED NEUROINFLAMMATION

А. Ю. Коток[1,2], Е. А. Степаненко[1], И. В. Макарова[1], Д. Д. Марков[3], Л. Е. Андреева[1], Т. П. Герасимова[3], Н. А. Щербатова[1], В. З. Тарантул[1], В. В. Ненашева[1]

[1]*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*
[2]*Сколковский институт науки и технологий, Москва*
[3]*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю. М. Лопухина ФМБА, Москва*

A. Y. Kotok[1,2], E. A. Stepanenko[1], I. V. Makarova[1], D. D. Markov[3], L. E. Andreeva[1], T. P. Gerasimova[3], N. A. Scherbatova[1], V. Z. Tarantul[1], V. V. Nenasheva[1]

[1]*National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow*
[2]*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[3]*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow*

✉ kotok.alice@mail.ru

Аннотация

В работе было изучено влияние гиперэкспрессии гена *TRIM14* человека на поведение трансгенных мышей и экспрессию генов семейства *Trim* в мозге в норме и в условиях нейровоспаления.

Abstract

In this study, the effects of overexpression of the human gene *TRIM14* on the behavior of transgenic mice and the expression of *Trim* gene family in the brain under normal and neuroinflammatory conditions were investigated.

Нейровоспаление — это воспалительный процесс, протекающий в центральной нервной системе (ЦНС), который может развиваться при различных заболеваниях ЦНС, а также при инфекциях и травмах, и сопровождающийся повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, хемокинов, активных форм кислорода и низкомолекулярных сигнальных соединений, что может приводить к повреждению гематоэнцефалического барьера, нарушению синаптической передачи, гибели клеток мозга и другим вторичным повреждениям [1]. В настоящее время растет количество данных об участии в нейровоспалении белков семейства TRIM [2]. В частности, TRIM14 способствует нейровоспалению, активируя сигнальный путь NF-kB [3].

С целью оценки влияния гиперэкспрессии гена *TRIM14* человека на процессы, происходящие в ЦНС в норме и при нейровоспалении, мы проанализировали поведение двухмесячных самцов мышей контрольной линии (C57BL/6 X CBA) и полученных на ее основе двух трансгенных линий с гиперэкспрессией гена *TRIM14* человека [4] в «тесте принудительного плавания» (FST) и тесте «открытое поле» (ОП). Моделирование нейровоспаления осуществлялось путем однократного внутрибрюшинного введения липополисахарида (ЛПС) в дозе 100–800 мкг/кг массы тела животного, в качестве отрицательного контроля вводился физраствор.

Было обнаружено, что в норме мыши обеих трансгенных линий проявляли меньшую склонность к тревожно- и депрессивноподобному поведению по сравнению с мышами контрольной линии (достоверно снижено время иммобильности в FST и увеличено расстояние, пройденное мышами трансгенных линий в центре ОП). Однако введение 800 мкг/кг ЛПС увеличивало время иммобильности в FST у трансгенных животных, что может указывать на более выраженное нейровоспаление под влиянием гиперэкспрессии *TRIM14*.

К настоящему времени известно, что белки семейства TRIM могут участвовать в различных молекулярных процессах совместно, например организуясь в сложные мультимерные комплексы [5]. С целью поиска по-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

© А. Ю. Коток, Е. А. Степаненко, И. В. Макарова, Д. Д. Марков, Л. Е. Андреева, Т. П. Герасимова, Н. А. Щербатова, В. З. Тарантул, В. В. Ненашева, 2025

тенциальных партнеров TRIM14 в регуляции нейровоспаления мы провели анализ паттернов экспрессии ряда генов семейства *Trim*, для которых известно участие в функционировании ЦНС [2], в коре больших полушарий, гиппокампе, мозжечке и среднем мозге контрольных и трансгенных животных в норме (табл. 1) и в условиях нейровоспаления (табл. 2).

Таблица 1

Изменение экспрессии генов *Trim* в тканях мозга трансгенных мышей по сравнению с контрольными животными в физиологических условиях

Паттерны экспрессии	Область мозга	
	Средний мозг	Мозжечок
Экспрессия у обеих трансгенных линий повышена	*Trim6, 34*	*Trim6*
Экспрессия у обеих трансгенных линий понижена	*Trim24, 41, 67*	

Таблица 2

Изменение экспрессии генов *Trim* в тканях мозга трансгенных и (или) контрольной линии мышей при индукции воспаления

Изменение экспрессии под действием ЛПС	Область мозга			
	Кора больших полушарий	Средний мозг	Гиппокамп	Мозжечок
Однонаправленно в контрольной и трансгенных линиях мышей	*Trim17, 18, 67*	*Trim1, 6, 34*		
Только в контрольной линии	*Trim9*	*Trim24, 62, 69, 72*		*Trim34, 67*
Однонаправленно в обеих трансгенных линиях		*Trim8, 9, 16, 41, 63*	*Trim6, 17, 34*	*Trim6*

Было обнаружено, что гиперэкспрессия гена *TRIM14* человека приводит к изменению профилей экспрессии ряда генов семейства *Trim* в различных отделах мозга мышей в норме и в условиях воспаления. Мы предполагаем, что эти гены *Trim* могут являться потенциальными партнерами *TRIM14* в ЦНС в норме и при нейровоспалении.

Литература

1. DiSabato D. J., Quan N., Godbout J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details // J. Neurochem. 2016. Vol. 139. P. 136–153.

2. Dudley-Fraser J., Rittinger K. It's a TRIM-endous view from the top: the varied roles of TRIpartite Motif proteins in brain development and disease // Front Mol. Neurosci. 2023. Vol. 16. P. 1–22.

3. Xie X., Wang F., Li X. Inhibition of TRIM14 protects cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating NF-κB/NLRP3 pathway-mediated inflammation and apoptosis // J. Receptors Signal Transduction. 2022. Vol. 42, No. 2. P. 197–205.

4. Nenasheva V. V. et al. Human TRIM14 protects transgenic mice from influenza A viral infection without activation of other innate immunity pathways // Genes Immun. 2021. Vol. 22, No. 1. P. 56–63.

5. Napolitano L. M., Meroni G. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation // IUBMB Life. 2012. Vol. 64, No. 1. P. 64–71.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-260

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГЛИКИРОВАНИЯ МИКРООКРУЖЕНИЯ НА ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МАТРИСОМА ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

EVALUATION OF THE EFFECT OF MICROENVIRONMENT GLYCATION ON THE MATRISOME GENE EXPRESSION OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS *IN VITRO*

Э. Р. Кудашева[1], А. А. Москалев[1], З. Г. Гуватова[1,2]

[1]*Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва*
[2]*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

E. R. Kudasheva[1], A. A. Moskalev[1], Z. G. Guvatova[1,2]

[1]*Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow*
[2]*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

✉ evelinn_a@mail.ru

Аннотация

Изучено влияние гликирования коллагенового матрикса на профиль экспрессии генов дермальных фибробластов человека. С использованием курируемых баз данных MatrisomeDB и GenAge получен список генов матрисома, изменение экспрессии которых ассоциировано со старением.

Abstract

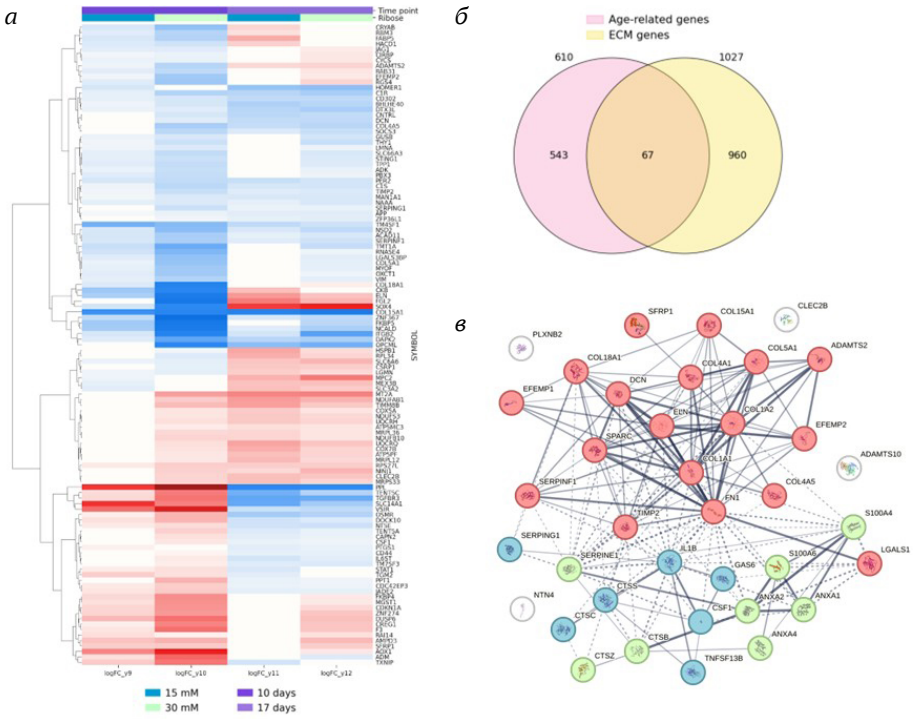
The effect of glycation of the collagen matrix on the gene expression profile of human dermal fibroblasts has been studied. Using MatrisomeDB and GenAge curated databases, a list of matrisome genes whose expression changes is associated with aging was obtained.

Накопление повреждений в долгоживущих макромолекулах, в том числе в белках внеклеточного матрикса (ВКМ), таких как коллаген и эластин, является одним из молекулярных признаков старения. Гликирование и накопление конечных продуктов гликирования (КПГ) сказывается на функционировании многих тканей и способствует развитию различных патологических состояний. Изменения состава и структуры ВКМ, включая возрастное накопление КПГ и увеличение жесткости матрикса, воздействуют на клетки через различные сигнальные каскады, приводя к изменению экспрессии генов [1].

В этом исследовании мы провели анализ транскриптома (RNA-seq) нормальных диплоидных фибробластов человека HdFb (d75), культивируемых в искусственно «состаренном» посредством неферментативного гликозилирования коллагеновом матриксе. 3D-гидрогели были подготовлены из раствора концентрированного коллагена I типа Viscoll (ООО «Имтек», Россия). В качестве гликирующего агента была использована D-рибоза (Sigma-Aldrich, США) в различных концентрациях (0; 15; 30; 200 mM), которая добавлялась в питательную среду после полимеризации геля с последующей инкубацией в течение 5 дней для обеспечения перекрестных сшивок. Проведенный на 10-й день культивирования анализ автофлуоресценции подтвердил дозозависимое накопление КПГ в исследуемых образцах. Наибольший уровень автофлуоресценции (что указывает на более высокие уровни КПГ) был зафиксирован в гидрогелях, обработанных 200 mM рибозой. Оценка биомеханических показателей гликированных 3D-гелей с клетками и без (контроль) с помощью реологического анализа показала, что с увеличением концентрации рибозы и временем культивирования жесткость гидрогелей также увеличивается. Однако анализ жизнеспособности клеток выявил, что концентрации рибозы свыше 20 mM приводят к дозозависимому снижению жизнеспособности клеток. Наши данные согласуются с результатами Ванесы Висенс-Зигмунт с соавторами, которые показали, что высокие концентрации рибозы (240 mM) приводят к клеточной смерти, тогда как низкие дозы способны сшивать коллаген и повышают жесткость матрикса, при этом сохраняя жизнеспособность клеток и обеспечивая их рост [2].

Известно, что стареющие клетки выделяют факторы роста, хемокины, протеазы, интерлейкины, которые образуют секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP). Согласно полученным RNA-seq данным, гликирование микроокружения повлияло на экспрессию многих SASP-генов: *MMP3*(↑), *DKK1*(↓), *EDN*(↓), *CXCL8*(↑), *CXCL1*(↑) и т. д. Интересно, что при длительном культивировании клеток в гликированных матриксах

© Э. Р. Кудашева, А. А. Москалев, З. Г. Гуватова, 2025



Дифференциально экспрессирующиеся гены: *а* — изменение экспрессии генов SASP в клетках HdFb (d75) в условиях гликирования; *б* — диаграмма Венна, иллюстрирующая пересечение генов из баз данных MatrisomeDB и GenAge; *в* — дифференциально экспрессирующиеся в условиях гликирования гены матрисома, ассоциированные со старением

экспрессия генов SASP была менее выраженной, что может быть связано с временной регуляцией SASP (см. рисунок, *а*) [3].

Мы также сравнили полученные списки дифференциально экспрессирующихся генов со списком генов матрисома человека, полученного из базы данных MatrisomeDB (https://matrisomedb.org). В базе данных MatrisomeDB насчитывается 274 гена, кодирующие коровые белки матрисома, и 753 гена матрисом-ассоциированных белков. Коровый матрисом включает 3 категории: гликопротеины, коллагены и протеогликаны. К белкам, ассоциированным с матрисомой, относятся ВКМ-аффилированные белки, регуляторы ВКМ и секретируемые факторы. Мы составили топ-10 ДЭ генов для каждой категории. Показано, что гликирование микроокружения ведет к снижению экспрессии генов, кодирующих коллагены (*COL21A1*, *COL12A1*, *COL4A1*), увеличению экспрессии генов, кодирующих металлопротеиназы (*MMP3, MMP11, MMP12*), ADAM-протеазы (*ADAM33, ADAM23, ADAMTS3, AD AMTS7*) и катепсины (*CTSL, CTSS, CTSB*). Кроме того, мы обнаружили, что гликирование приводит к изменениям в экспрессии многих генов, ассоциированных со старением и долголетием (согласно базе данных GenAge https://genomics.senescence.info/genes/index.html). В результате сравнения генов из баз данных MatrisomeDB и GenAge было получено 67 генов матрисома, изменение экспрессии которых ассоциировано со старением (см. рисунок, *б*). Из них 37 генов дифференциально экспрессировались в фибробластах, культивируемых в 3D-условиях с добавлением рибозы (см. рисунок, *в*). Известно, что стохастические неферментативные модификации ВКМ, включая гликирование, тесно связаны с признаками старения [4]. Таким образом, оценка изменений матрисома при гликировании и выявление его роли в старении является необходимым шагом для понимания биологии старения, а также для разработки релевантных антивозрастных подходов.

Литература

1. Vidovic T., Ewald C. E. Longevity-Promoting Pathways and Transcription Factors Respond to and Control Extracellular Matrix Dynamics During Aging and Disease // Front Aging. 2022. Vol. 3. P. 935220.

2. Vicens-Zygmunt V., Estany S., Colom A. Fibroblast viability and phenotypic changes within glycated stiffened three-dimensional collagen matrices // Respir. Res. 2015. Vol. 16. P. 82.

3. Giroud J., Bouriez I. Exploring the Communication of the SASP: Dynamic, Interactive, and Adaptive Effects on the Microenvironment // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24 (13). P. 10788.

4. Fedintsev A., Moskalev A. Stochastic non-enzymatic modification of long-lived macromolecules: a missing hallmark of aging // Ageing Res Rev. 2020. Vol. 62. P. 101097.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-261

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ АРБУСКУЛЯРНО-МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ *

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF PLANT GROWTH STIMULANTS BASED ON ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI

Т. Р. Кудряшова[1,2], А. А. Крюков[2], А. П. Юрков[2]

[1]*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*
[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург*

T. R. Kudriashova[1,2], A. A. Kryukov[2], A. P. Yurkov[2]

[1]*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*
[2]*All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology, Saint Petersburg*

✉ tahacorfu@yandex.ru

Аннотация

В работе представлены промежуточные результаты по разработке предиктивного метода оценки эффективности стимуляторов роста растений на основе грибов арбускулярной микоризы. Были проанализированы относительные уровни экспрессии генов из трех ключевых семейств у модельного растения *Medicago lupulina* в симбиозе с грибом *Rhizophagus irregularis* в ключевые стадии онтогенеза растения-хозяина при различных условиях с целью выявления генов-маркеров.

Abstract

The article presents interim results on the development of a predictive method for evaluating the effectiveness of plant growth stimulants based on arbuscular mycorrhiza fungi. The relative expression levels of genes from three key families in the model plant *Medicago lupulina* in symbiosis with the fungus *Rhizophagus irregularis* at key stages of host plant ontogenesis under various conditions were analyzed in order to identify marker genes.

Интенсивное развитие сельского хозяйства, повышение нагрузки на агроэкосистемы обусловлены ростом потребностей населения мира в сельскохозяйственной продукции. Особенно возрастают в 2025 г. тенденции к все большему разведению скота, а также к увеличению производства животноводческой и мясной продукции. В связи с этим экспертам в области сельского хозяйства необходимо больше внимания уделить возделыванию кормовых культур. Например, люцерна обладает большим количеством белка, это отличный сидерат, она подходит для ремедиации почв и считается лекарственным растением. За счет антропогенного воздействия нарушается микробный состав почв, что приводит к ухудшению плодородия и снижению урожаев. По данным Росстата, наблюдается ежегодный рост применения минеральных удобрений, их использование достигло 3,43 млн т. Все большую актуальность приобретает использование биоудобрений на основе микробной биомассы, что способствует восстановлению деградированных земель. Разрабатываются новые способы возделывания сельскохозяйственных культур на основе биологического земледелия с использованием биопрепаратов, разработанных на основе ряда микроорганизмов — бактерий и грибов — и по результатам селекции симбиотических растительно-микробных систем. Наиболее распространенным из них и экологически значимым является арбускулярная микориза (АМ), формируемая более чем 92 % семейств растений с грибами отдела Glomeromycota.

Грибы арбускулярной микоризы играют ключевую роль в наземных экосистемах, усиливая питание растений, особенно фосфорное, повышая адаптацию растений к стресс-факторам среды биотической и абиотической природы, принимая участие в восстановлении нарушенных земель. Помимо защиты растений от патогенов, грибы АМ нормализуют водный баланс растения, а также регулируют водный транспорт, особенно в условиях засухи с помощью изменения экспрессии генов аквапоринов у растения-хозяина. В настоящее время ведется активная разработка биопрепаратов — усилителей роста растений на основе этих грибов, несмотря на их облигатный статус по отношению к растению-хозяину. При АМ-симбиозе кортикальные клетки корня создают периарбускулярную мембрану, окутывающую каждую арбускулу АМ-гриба, тем самым отделяя гриб от цитоплазмы растения. Этот процесс устанавливает симбиоз между растениями и грибами с целью обмена между симбионтами питательных веществ. Рынок АМ-биопрепаратов постоянно обновляется, а вот их эффективность почти всегда неизвестна. Обычно это сухие смеси — порошки, имеющие низкую или нулевую эффективность для растений.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-76-00068).

© Т. Р. Кудряшова, А. А. Крюков, А. П. Юрков, 2025

Исследования в ряде случаев показали отсутствие грибов АМ в таких препаратах. Закупка и использование таких препаратов без проверки эффективности наносит вред для сельского хозяйства. Соответственно, промышленное сельское хозяйство нуждается в протоколах и методах для проверки таких препаратов в полевых условиях.

Для оценки эффективности препаратов на основе АМ грибов будет использоваться анализ относительных уровней экспрессии симбиотических генов-маркеров, в первую очередь генов аквапоринов, генов транспорта сахаров и фосфора (AQP, SWEET, PHT). Такой метод позволит определять эффективность АМ-симбиоза уже на ранних стадиях развития растения-хозяина, предотвратив возможные убытки от некачественных биопрепаратов.

Нами были проанализированы относительные уровни экспрессии генов из трех ключевых семейств у модельного растения люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L.) в симбиозе с грибом АМ *Rhizophagus irregularis* в ключевые стадии онтогенеза растения-хозяина (розетка, начало стеблевания, стеблевание, начало бокового ветвления, боковое ветвление и цветение) при различных условиях (три уровня биодоступного фосфора в субстрате — Рд, недостаток влаги). По проведенным исследованиям гены-кандидаты в маркеры эффективного АМ симбиоза из семейства фосфорных транспортеров — *MlPT4*, транспортеров углеводов — *MlSWEET1b*, *MlSWEET3c* и *MlSWEET16*, аквапоринов — *NIP2.1, NIP 4.2*. Эти гены рекомендуются к применению для тестирования эффективности АМ-симбиозов в полевых условиях с целью проверки качества биопрепаратов. Подобранная нами для исследований растительно-микробная система «*M. lupulina* + *R. irregularis*» высокопродуктивна и эффективна. При инокуляции продуктивность надземной биомассы *M. lupulina* составила до 1,8 раза в условиях низкого уровня Рд. Наиболее развитая микоризация — в условиях низкого уровня фосфора (*F* — от 70,6 ± 3,0 до 98,1 ± 0,4 %), при этом обилие арбускул (*a*, %) сохранялось на всех этапах развития растения-хозяина при всех используемых условиях этого исследования.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-262

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПОЛИГАЛАКТУРОНАТОМ НАТРИЯ*

SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF STABILIZED BY SODIUM POLYGALACTURONATE SILVER NANOPARTICLES

Е. В. Кузнецова[1], А. В. Немтарев[1,2], Д. В. Салахиева[1], Т. И. Салихова[1], В. Ф. Миронов[2], Т. И. Абдуллин[1]

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

E. V. Kuznetcova[1], A. V. Nemtarev[1,2], D. V. Salakhieva[1], T. I. Salikhova[1], V. F. Mironov[2], T. I. Abdullin[1]

[1]Kazan Federal University
[2]Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry — Kazan Scientific Center RAS

✉ e_v_kuznetsova@bk.ru

Аннотация

Исследовано формирование наночастиц серебра при восстановлении ионов серебра глюкозой в присутствии полигалактуроната натрия. Подтверждено образование коллоидно-стабильных наночастиц серебра, которые были охарактеризованы на предмет структурных и антибактериальных свойств.

Abstract

Formation of silver nanoparticles upon reduction of silver ions with glucose in the presence of polygalacturonan was studied. Colloidally stable silver nanoparticles were obtained, and their structural and antibacterial properties were characterized.

Соединения серебра (СС) являются важными объектами исследований и разработок в области антимикробных средств, включая лекарственные препараты (медицинские, ветеринарные) и материалы медицинского назначения. По причине того, что СС проявляют высокую активность в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также низкого риска развития резистентности к СС, актуальной задачей является разработка эффективных антибактериальных агентов на основе СС, содержащих наночастицы серебра, с пролонгированной антибактериальной активностью и повышенным профилем безопасности. Перспективным подходом к ее решению является применение принципов «зеленой» химии, которые позволяют генерировать наночастицы серебра с использованием нетоксичных и доступных реагентов, не требующих их удаления из конечной композиции.

В работе исследованы условия получения наночастиц серебра при восстановлении ионов серебра D-глюкозой в присутствии полигалактуроната натрия. Источником серебра служили $AgNO_3$ и $[Ag(NH_3)_2]OH$; количество вводимого в реакцию серебра варьировали в диапазоне от 1 до 25 мол%. Получен ряд коллоидных препаратов серебра, имеющих отрицательный заряд, большинство из которых были стабильны в водной системе.

Согласно УФ-спектроскопии, полученные продукты характеризовались наличием уширенных полос поглощения с максимумом в диапазоне λ 410–450 нм, соответствующие поверхностному резонансному плазмонному поглощению наночастиц серебра (размер около 42–70 нм). Использование $[Ag(NH_3)_2]OH$ в качестве источника серебра в сравнении с $AgNO_3$ позволяет более полно восстанавливать Ag^+ в комплексе. Полученные композиты были охарактеризованы методом синхронного термического анализа ТГ–ДСК (термогравиметрии и дифференциальной сканирующей калориметрии), согласно которому для полигалактуронатов серебра характерно две стадии потери массы, обусловленные потерей воды и декарбоксилированием полигалактуроната. Было установлено, что с повышением содержания серебра в комплексах их термостабильность повышается.

По данным метода микроразведений, полученные комплексы серебра ингибировали рост грамотрицательных и грамположительных бактерий. При использовании $AgNO_3$ достигались меньшие значения МИК (в пересчете на серебро, 13 мкг/мл), чем в случае $[Ag(NH_3)_2]OH$ (31–63 мкг/мл), что, по-видимому, связано с различием в размерах наночастиц серебра в конечных комплексах. По данным резазуринового метода, полученные комплексы серебра обладали умеренной токсичностью в отношении клеток млекопитающих. Результаты представляют интерес для разработки безопасных и эффективных антибактериальных агентов и материалов на их основе.

* Исследование выполнено за счет гранта, предоставленного в 2024 г. Академией наук Республики Татарстан, на осуществление фундаментальных и прикладных научных работ в научных и образовательных организациях, предприятиях и организациях реального сектора экономики Республики Татарстан.

© Е. В. Кузнецова, А. В. Немтарев, Д. В. Салахиева, Т. И. Салихова, В. Ф. Миронов, Т. И. Абдуллин, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-263

СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА С ДЕФЕКТОМ ИНТЕГРАЗЫ

CREATION OF A LENTIVIRAL VECTOR WITH AN INTEGRASE DEFECT

В. В. Куликов, Д. Н. Щербаков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
Алтайский государственный университет, Барнаул

V. V. Kulikov, D. N. Shcherbakov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
Altai State University, Barnaul

✉ coolervvk@gmail.com

Аннотация

Длительная экспрессия терапевтических генов, доставляемых вирусными векторами, может вызывать нежелательные эффекты. Для временной экспрессии разработан лентивирусный вектор с дефектом интегразы на основе плазмиды psPAX2. Сайт-направленным мутагенезом был получен вектор pPaxID сохраняющий способность эффективной трансдукции клеток, обеспечивая временную экспрессию с минимальным риском интеграции, что повышает безопасность генной терапии.

Abstract

Prolonged expression of therapeutic genes delivered by viral vectors can cause undesirable effects. A lentiviral vector with an integrase defect based on the psPAX2 plasmid has been developed for temporary expression. Site-directed mutagenesis produced the pPaxID vector, which preserves the ability of effective cell transduction, providing temporary expression with minimal risk of integration, which increases the safety of gene therapy.

Введение

Лентивирусные векторы (ЛВ) являются эффективным инструментом для доставки генетического материала в труднотрансфецируемые клетки, включая делящиеся и неделящиеся. Однако их способность к стабильной интеграции в геном хозяина несет риски инсерционного мутагенеза и долговременной неконтролируемой экспрессии трансгена. Это ограничивает их применение в случаях, где требуется временный эффект или минимизация генотоксичности. Векторы с дефицитом интегразы (IDLV) образуют неинтегрирующие эписомы, обеспечивая ограниченную во времени экспрессию доставленной кассеты, что значительно снижает связанные с интеграцией риски [1].

Материалы и методы

За основу взят плазмидный вектор psPAX2, кодирующий структурные белки лентивируса. Для инактивации интегразы методом сайт-направленного мутагенеза (ПЦР с праймерами, несущими точечную мутацию) в каталитическом домене *int* (D64E) амплифицирован фрагмент гена *pol*. Мутантный ПЦР-продукт обработан рестриктазой Bst AUI и лигирован обратно в psPAX2, замещая исходный фрагмент. Клоны отобраны на ампициллине, плазмидная ДНК секвенирована для подтверждения мутации.

Результаты и обсуждение

1. Конструирование pPax-ID: успешно создан мутантный вектор pPax-ID, несущий ключевую замену D64E в гене интегразы. Эта мутация в домене интегразы критически нарушает способность интегразы осуществлять стабильную интеграцию провируса в геном.

2. Подтверждение мутации: секвенирование целевого региона гена pol подтвердило наличие требуемой замены нуклеотидов (GAT -> GAG), приводящей к замене D на E.

3. Принцип работы IDLV: полученный pPax-ID используется в трехплазмидной системе для производства вирусных частиц. Такие частицы трансдуцируют клетки-мишени, доставляя генетический материал в ядро. Из-за дефекта интегразы ДНК вектора остается в форме эписомы, обеспечивая *временную* экспрессию доставленной генетической конструкции. Эписомы постепенно деградируют в процессе деления клеток и внутриклеточных процессов.

© В. В. Куликов, Д. Н. Щербаков, 2025

4. Преимущества IDLV

– Повышенная безопасность: резкое снижение риска инсерционного мутагенеза по сравнению с интегрирующими лентивирусами.

– Временная экспрессия: обеспечивает ограниченную во времени экспрессию целевого гена/элемента, что критично для многих терапевтических подходов.

– Широкая применимость: сохраняет высокую эффективность трансдукции лентивирусов в широкий спектр клеток, включая неделящиеся.

– Большая емкость: обладает превосходной упаковочной способностью (> 8 kb).

Заключение

Разработан лентивирусный вектор pPax-ID с инактивированной интегразой. Ключевым преимуществом этого вектора является способность обеспечивать эффективную, но временную экспрессию доставляемых генетических конструкций (терапевтических генов, регуляторных РНК, репортеров и др.) при минимальном риске стабильной интеграции в геном хозяина. Это делает pPax-ID ценным инструментом для безопасной генной терапии, требующей временного эффекта, функциональной геномики и исследований, где долговременная экспрессия нежелательна или несет риски. Полученная конструкция пригодна для производства вирусных частиц третьего поколения.

Литература

1. Philpott N. J., Thrasher A. J. Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy // Human Gene Therapy. 2007. Vol. 18, No. 6. P. 483–489.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-264

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КАРОТИНОГЕНЕЗА ВЫЯВЛЯЕТ ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ В ОРГАНАХ ЧЕСНОКА *

CAROTENOGENESIS GENE EXPRESSION PROFILE REVEALS THE SPECIFICITIES OF CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN GARLIC ORGANS

М. М. Ларионов[1], М. А. Филюшин[2]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

M. M. Larionov[1], M. A. Filyushin[2]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow*

✉ michel7753@mail.ru

Аннотация

В геноме чеснока впервые идентифицированы все основные структурные гены пути биосинтеза каротиноидов. Определены профили экспрессии идентифицированных генов, максимальные уровни экспрессии детектированы, ожидаемо, в листьях чеснока. Наличие экспрессии генов каротиногенеза в нефотосинтезирующих органах (корни, донце, луковица) вкупе с отсутствием детектируемого содержания каротиноидов может быть связано с активностью путей биосинтеза фитогормонов.

Abstract

In the garlic genome all major structural genes of the carotenoid biosynthesis pathway have been identified. The expression profiles of the identified genes have been determined, and the maximum expression levels have been detected, as expected, in garlic leaves. The presence of carotenogenesis gene expression in non-photosynthetic organs (roots, basal plate, bulb) coupled with the absence of detectable carotenoid content may be associated with the activity of phytohormone biosynthesis pathways.

Каротиноиды являются одним из основных классов пигментов в растениях, функции которых в растительных клетках разнообразны. Ключевой функцией каротиноидов является фотозащита, так как благодаря своей химической структуре они обладают антиоксидантными свойствами и нейтрализуют активные формы кислорода [1]. Каротиноиды также являются субстратом для синтеза фитогормонов — абсцизовой кислоты (АБК) и стриголактонов.

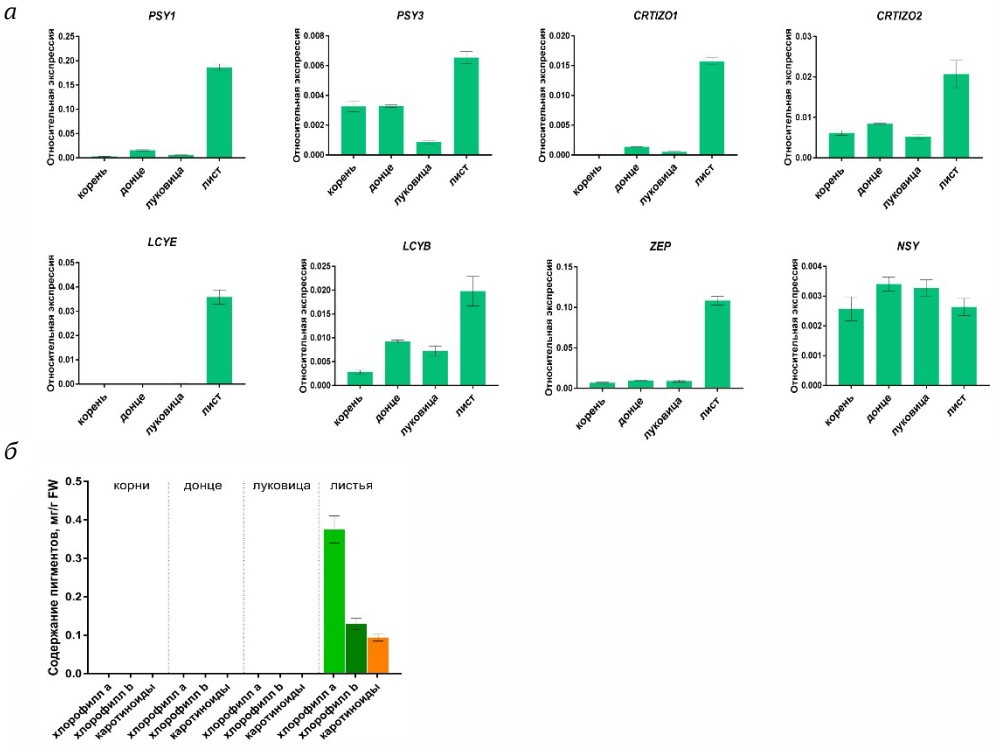
Путь биосинтез каротиноидов у высших растений высоко консервативен, определены все ферменты пути и кодирующие их гены [2]. Исходным субстратом для синтеза каротиноидов является фитоин, из которого в результате нескольких реакций десатурации образуется ликопин, являющийся предшественником α- и β-каротинов. В результате дальнейших ферментативных реакций происходит насыщение β-каротина атомами кислорода и образование ксантофиллов — β-криптоксантина, зеаксантина, антраксантина и виолоксантина. Несмотря на значимость каротиноидов для жизни растения, у чеснока (*Allium sativum* L.) гены каротиногенеза не изучены. Целью работы была идентификация в геноме чеснока и характеристика ключевых структурных генов каротиногенеза.

В геноме чеснока *A. sativum* [3] нами впервые идентифицированы гомологи всех известных структурных генов пути биосинтеза каротиноидов. Всего был идентифицирован и охарактеризован 21 ген пути биосинтеза каротиноидов, определена их локализация в геноме и основные физико-химические свойства. Выявлено, что практически каждый фермент пути каротиногенеза у чеснока кодируется несколькими генами. Для проведения РВ-ПЦР были разработаны специфичные праймеры к 8 генам пути биосинтеза каротиноидов.

На основе данных транскриптомного анализа чеснока сорта Ershuizao [3] были определены профили экспрессии генов биосинтеза каротиноидов в различных органах (корни, листья, ложный стебель, бутоны, цветки, проростки) и на восьми стадиях развития луковиц. Показано, что большинство идентифицированных генов каротиногенеза, ожидаемо, экспрессируются преимущественно в надземных фотосинтезирующих органах (листья, ложный стебель, проростки). Поздние гены каротиногенеза (*AsVDE*, *AsNSY*, *AsNCED*), синтезирующие субстрат для АБК, наиболее активны в бутонах и цветках, что, по-видимому, может быть связано участием АБК в развитии генеративных органов. Экспрессия большинства генов каротиногенеза выявлена и в корнях чеснока, при этом для ряда генов (*AsPSY3*, *AsNCED1, AsNCED*2, *AsNCED*5) в корнях наблюдался максимум их экспрессии.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-76-10005).

© М. М. Ларионов, М. А. Филюшин, 2025



Профили экспрессии генов пути биосинтеза каротиноидов (*а*) и содержание пигментов (*б*) в различных органах чеснока сорта Скорпион

В органах чеснока сорта Скорпион методом РВ-ПЦР определены профили экспрессии 8 генов пути биосинтеза каротиноидов и содержание хлорофилла и каротиноидов (см. рисунок). Максимальные уровни экспрессии анализируемых генов выявлены в листьях, за исключением гена неоксантинсинтазы *AsNSY*, который экспрессировался на сходном уровне во всех органах (см. рисунок, *А*). Интересно отметить, что экспрессия всех анализируемых генов выявлена в нефотосинтезирующих органах — корнях, донце и луковице, за исключением гена ликопинциклазы *AsLCYE*, транскрипция которого детектирована только в листьях (см. рисунок, *а*).

Биохимический анализ выявил содержание хлорофилла и каротиноидов только в листьях, при этом соотношение хлорофилла *a/b* составило 2,9, что соответствует нормальному соотношению (~ 3,0) для фотосинтезирующих растений и свидетельствует об оптимальных условиях при выращивании и отсутствии воздействия стрессовых факторов (см. рисунок, *б*).

Таким образом, в геноме чеснока впервые идентифицированы все основные структурные гены пути биосинтеза каротиноидов. В органах чеснока определены профили экспрессии идентифицированных генов, максимальные уровни экспрессии детектированы в листьях чеснока. Наличие экспрессии генов каротиногенеза в нефотосинтезирующих органах (корни, донце, луковица) при отсутствии детектируемого содержания каротиноидов может быть связано с тем, что в этих органах они активно используются в качестве субстрата для синтеза фитогормонов.

Литература

1. Sun T., Rao S., Zhou X., Li L. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives // Mol. Hortic. 2022. Vol. 2 (1). Art. 3.

2. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // Carotenoids Nat. Subcellular Biochem. Springer, Cham. 2016. Vol. 79. P. 35–69.

3. Sun X., Zhu S., Li N. et al. A chromosome-level genome assembly of garlic (*Allium sativum*) provides insights into genome evolution and allicin biosynthesis // Mol. Plant. 2020. Vol. 13 (9). P. 1328–1339.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-265

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕРМИНАТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭПИСОМАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

REGULATION OF EPISOMAL GENE EXPRESSION BY RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTION TERMINATORS IN MAMMALS

А. Е. Летягина[1,2], Л. В. Болдырева[1], А. А. Огиенко[1], Ю. А. Галимова[1], Е. Н. Андреева[1], Е. С. Омелина[1]

[1] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

A. E. Letiagina[1,2], L. V. Boldyreva[1], A. A. Ogienko[1], Y. A. Galimova[1], E. N. Andreyeva[1], E. S. Omelina[1]

[1] *Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ leshchenkoanya@gmail.com

Аннотация

Нами было исследовано влияние последовательности, расположенной в области +17..56 п. н. после сигнала полиаденилирования репортерного гена улучшенного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) на уровень его мРНК методом массового параллельного репортерного анализа (МПРА). Положение этой последовательности соответствует DSE. Было показано, что изменение последовательности этого района позволяет варьировать уровень мРНК и белка eGFP в широких пределах.

Abstract

We investigated the effect of a sequence located in the +17..56 bp region after the polyadenylation signal (PAS) of the enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) reporter gene on its mRNA level by Massively Parallel Reporter Assay (MPRA). The position of this sequence corresponds to the Downstream Sequence Element (DSE). Sequence variation of this region has been shown to alter eGFP mRNA and protein levels over a wide range.

Экспрессия генов является определяющим процессом в жизнедеятельности всех организмов, который сложным образом регулируется на всех его этапах. У эукариотических организмов основной вклад в активность генов вносят структура хроматина, определяемая взаимодействиями регуляторных белков со специфическими мотивами ДНК, а также процессинг (созревание) РНК. Исследование влияния различных последовательностей ДНК на регуляцию экспрессии гена является актуальной задачей генетики и биотехнологии. При этом роль регуляторных районов, расположенных выше промоторных последовательностей, в этом процессе изучена значительно лучше, чем районов, расположенных в 3′-областях генов.

У эукариот терминация транскрипции может оказывать значительное влияние на уровень экспрессии генов различными путями. Процессинг 3′-конца предшественника матричной РНК (пре-мРНК) и последующая терминация транскрипции белок-кодирующих генов основана на сборке функционального комплекса процессинга 3′-конца пре-мРНК. Нуклеотидный состав 3′-участка незрелого транскрипта влияет на то, какой именно вариант комплекса процессинга 3′ конца пре-мРНК будет сформирован и какой сигнал полиаденилирования (СПА) будет выбран. Нуклеотидные последовательности, индуцирующие и улучшающие сборку комплекса процессинга 3′-конца пре-мРНК, исследуются на протяжении последних 49 лет [1]. Однако информация о составе оптимальной последовательности Downstream Sequence Element (DSE) — одного из ключевых цис-элементов, принимающих участие в процессинге 3′-конца пре-мРНК, — остается неполной и противоречивой.

Одной из причин малой исследованности регуляторной роли терминаторов транскрипции является отсутствие технических подходов, позволяющих систематически идентифицировать функциональные элементы, расположенные после СПА и не входящие в последовательности зрелых (т. е. полиаденилированных) транскриптов. В настоящей работе использован метод массового параллельного репортерного анализа (МПРА), который позволяет одновременно измерять уровень транскрипционной активности большого числа (до нескольких миллионов) не интегрированных в геном трансгенов. Метод МПРА основан на кратковременной трансфекции культивируемых клеток ДНК-штрихкодированными репортерными конструкциями с последующим анализом их транскрипционной активности посредством высокопроизводительного параллельного секвенирования. В нашем случае основным инструментом для проведения МПРА были плазмидные библиотеки, содержащие два ключевых фрагмента: исследуемую последовательность (в этой работе условно названную «мутация») и штрихкод (ШК).

© А. Е. Летягина, Л. В. Болдырева, А. А. Огиенко, Ю. А. Галимова, Е. Н. Андреева, Е. С. Омелина, 2025

ШК и исследуемая последовательность обычно представляют собой короткие вариабельные последовательности, расположенные внутри и вне транскрипционной единицы соответственно. Таким образом, ШК могут быть использованы для количественной оценки влияния различных изучаемых последовательностей, отсутствующих в зрелых транскриптах, на представленность последних в трансфицированных клетках. Метод МПРА был использован для систематического диссекционного анализа DSE. DSE расположен на расстоянии 10–30 н. ниже сайта полиаденилирования и обеспечивает связывание белка CstF64 с молекулой пре-мРНК. DSE не входит в состав молекулы зрелой мРНК. Это делает его привлекательной мишенью для модуляции уровня экспрессии целевого гена.

В работе было показано, что последовательность и вторичная структура РНК в области DSE оказывают большое влияние на уровень зрелой мРНК и белка eGFP. Было показано, что оптимальная последовательность DSE обеспечивает эффективный процессинг 3′-конца пре-мРНК и снижает долю непроцессированных транскриптов, которые могут возникать при преждевременной терминации транскрипции РНК-полимеразы II независимо от разрезания 3′-конца пре-мРНК [2]. Неполиаденилированные транскрипты не могут транспортироваться в цитоплазму и быть транслированы [3]. Это делает терминаторы транскрипции РНК полимеразы II важными регуляторными элементами, позволяющими модулировать уровень экспрессии целевого гена.

Литература

1. Proudfoot N. J., Brownlee G. G. 3′ non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA // Nat. 1976. Vol. 263. P. 211–214.

2. Zhang H., Rigo F., Martinson H. G. Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site // Mol. Cell. Elsevier Inc., 2015. Vol. 59, No. 3. P. 437–448.

3. Liu J. et al. Molecular Insights into mRNA Polyadenylation and Deadenylation // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 19.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-266

АНАЛИЗ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТИЛЗАВИСИМОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *GLA*I

CALCULATION OF THE THERMODYNAMIC AND KINETIC CHARACTERISTICS OF THE *GLA*I METHYL-DEPENDENT RESTRICTION ENDONUCLEASE

В. Г. Мартюшова, М. Жежера, С. Е. Седых

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

V. G. Martyushova, M. Zhezhera, S. E. Sedykh

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University
Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, Novosibirsk

✉ vladislavamartyusova@gmail.com

Аннотация

Метилирование ДНК играет важную роль в эпигенетическом наследовании. Проведено исследование термодинамических и кинетических параметров метилзависимой эндонуклеазы рестрикции *Gla*I, играющей важную роль в эпигенетических исследованиях. Определены константы диссоциации, энергии Гиббса, а также кинетические параметры (K_m, V_{max}) для различных субстратов.

Abstract

DNA methylation plays an important role in epigenetic inheritance. A study was conducted on the thermodynamic and kinetic parameters of the methyl-dependent restriction endonuclease *Gla*I, which plays an important role in epigenetic research. The dissociation constants, Gibbs energies, and kinetic parameters (K_m, V_{max}) for various substrates were determined.

Метилирование ДНК — ключевой эпигенетический механизм, регулирующий экспрессию генов и поддерживающий стабильность генома. Метилирование ДНК играет критическую роль в развитии заболеваний, включая онкологические, аутоиммунные и нейродегенеративные. Изучение метилирования ДНК важно для поиска новых диагностических маркеров и персонализированных методов терапии. Для нахождения маркеров метилирования можно использовать метилзависимые эндонуклеазы рестрикции, например *Gla*I — фермент, специфически расщепляющий ДНК по сайтам, содержащим метилированные цитозины: R(5mC)↓GY. Благодаря этой особенности *Gla*I применяют в эпигенетических исследованиях, например в *Gla*I-ПЦР-анализе, который позволяет специфически детектировать метилированные и неметилированные сайты в образцах ДНК. Данная работа посвящена расчету термодинамических и кинетических характеристик метилзависимой эндонуклеазы рестрикции *Gla*I.

Проведен анализ термодинамических параметров *Gla*I: константы диссоциации (K_d) и энергии Гиббса ($\Delta G°$) методом задержки в геле, который основан на изменении электрофоретической подвижности ДНК-олигонуклеотида при образовании комплекса с белком, что позволяет количественно оценить взаимодействие фермента с субстратом. Для измерений использовали ^{32}P-радиоактивно меченые олигонуклеотиды. Полученные данные обрабатывали с помощью программы ImageQuant, были вычислены равновесные концентрации комплексов и определены значения K_d и $\Delta G°$ для дуплексов ДНК, содержащих метилированные и неметилированные остатки цитозинов в сайте рестрикции.

Кинетические параметры *Gla*I: константу Михаэлиса — Ментен (*Km*) и максимальную скорость (V_{max}) исследовали с помощью дуплексов ДНК-олигонуклеотидов, содержащих флуорофор (FAM) и тушитель (BHQ1) на противоположных концах. Гидролиз эндонуклеазой приводил к разделению флуорофора и тушителя и увеличению флуоресценции. Детекция изменения уровня флуоресценции во времени позволили измерить начальные скорости реакций для различных субстратов: метилированных, полуметилированных (содержащих метилированный цитозин в одной цепи дуплекса) и неметилированных.

Результаты исследования могут быть использованы для анализа термодинамических параметров и специфичности новых метилзависимых эндонуклеаз рестрикции.

© В. Г. Мартюшова, М. Жежера, С. Е. Седых, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-267

ФОРМИРОВАНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ ЗАЩИЩАЕТ КЛЕТКИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ОТ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ SRC, И ИХ ИНГИБИРОВАНИЕ МОЖЕТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАНО ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЭТОЙ УСТОЙЧИВОСТИ*

FORMATION OF INTERCELLULAR CONTACTS PROTECTS SOLID TUMOR CELLS FROM THE ACTION OF SRC INHIBITORS, AND INHIBITION OF INTERCELLULAR CONTACTS CAN BE USED TO OVERCOME THIS RESISTANCE

А. М. Михеева, В. С. Прасолов, Т. Д. Лебедев

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

A. M. Mikheeva, V. S. Prasolov, T. D. Lebedev

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ alesyamikheeva@gmail.com

Аннотация

Таргетная терапия является перспективным подходом к лечению рака. Ингибиторы Src киназ обладают значительным потенциалом, однако клетки солидных опухолей демонстрируют к ним устойчивость. Мы показали, что усиление межклеточных контактов в результате действия ингибитора Src бозутиниба лежит в основе невосприимчивости клеток, а подавление межклеточных контактов существенно усиливает действие ингибитора.

Abstract

Targeted therapy is a promising approach to cancer treatment. Src kinase inhibitors have significant potential, but solid tumor cells show resistance to them. We have shown that increased intercellular contacts as a result of the action of the Src inhibitor bosutinib underlie cell immunity, and suppression of intercellular contacts significantly enhances the effect of the inhibitor.

В отличие от традиционной химиотерапии, таргетные препараты воздействуют на конкретные молекулярные мишени, что позволяет минимизировать токсичное влияние на организм. Выбор таргетного препарата основан на изменении активности определенных молекулярных мишеней в злокачественных опухолях. Среди таких мишеней широко известны нерецепторные тирозинкиназы семейства Src за счет того, что ген Src является первым открытым и описанным онкогеном. Среди солидных раковых опухолей было отмечено повышение активности тирозинкиназ семейства Src по сравнению с их активностью в клетках здоровых тканей. Это открывает перспективы для успешного применения ингибиторов киназ Src в терапии злокачественных опухолей. Однако в ходе клинических исследований было показано, что опухоли слабо поддаются такому лечению. Для того чтобы выяснить причину невосприимчивости солидных опухолей к действию ингибиторов Src, нами было изучено действие ингибитора Src бозутиниб на клетки различных типов рака, этот ингибитор уже зарекомендовал себя как безопасный для людей, так как уже одобрен для лечения хронического миелолейкоза. Цель работы — выяснить, почему солидные опухоли не реагируют на ингибиторы Src, в частности бозутиниб, и какие механизмы могут быть задействованы в этом процессе.

В ходе изучения действия бозутиниба на клетки солидных опухолей линий немелкоклеточного рака легких и нейробластомы наше внимание привлекла характерная черта бозутиниба вызывать образование плотных клеточных групп. В результате покадровой съемки на протяжении 48 ч мы наблюдали, что клетки, взаимодействующие друг с другом, становились неподвижными и начинали делиться, образуя клеточную группу. Единичные клетки при этом погибали. Для изучения причин снижения подвижности клеток мы провели окрашивание красителем на F-актин фиксированных клеток через 6, 24 и 72 ч после добавления бозутиниба, в результате чего наблюдали, что неподвижность клеток определяется образованием и накоплением актиновых нитей и стресс-фибрилл. При этом клетки по мере увеличения количества соседей становились более устойчивыми к действию бозутиниба.

В ходе скрининга препаратов мы показали, что ингибитор PIM киназ (PIM-447) усиливает действие бозутиниба, в том числе в сфероидах, в которых клетки характеризуются наличием большого количества клеточ-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-74-10103).

© А. М. Михеева, В. С. Прасолов, Т. Д. Лебедев, 2025

ных взаимодействий. Возможно, этот эффект вызван влиянием PIM-447 на снижение межклеточных контактов. И как нами впоследствии было показано, бозутиниб приводит к накоплению белка клеточной адгезии бета-катенина, который отвечает за межклеточное взаимодействие, у периферии клеток, а добавление к бозутинибу PIM-447 вызывает изменение локализации бета-катенина от периферии к центральной части клеток в группе. В ходе работы мы показали, что устойчивость клеток солидных опухолей к ингибиторам Src зависит от плотности межклеточных контактов и может быть снижена при добавлении PIM-447 в условиях комбинированной терапии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-268

ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОЙ МЕТКИ НА ОСНОВЕ ФЛУОРОГЕН-АКТИВИРУЮЩЕГО БЕЛКА PICOFAST*

OPTIMIZATION OF THE PROPERTIES OF A GENETICALLY ENCODED TAG BASED ON THE FLUOROGEN-ACTIVATING PROTEIN PICOFAST

Д. А. Мустафин[1,2], С. А. Краснова[1], М. С. Баранов[1,3], Ю. А. Богданова[1,3]

[1]Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва
[2]Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[3]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва

D. A. Mustafin[1,2], S. A. Krasnova[1], M. S. Baranov[1,3], Y. A. Bogdanova[1,3]

[1]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow
[2]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
[3]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

✉ denis.a.mustafin@yandex.ru

Аннотация

В ходе разработки сплит-системы на основе флуороген-активирующего белка nanoFAST было выяснено, что его N-фрагмент, состоящий из 87 аминокислот, сам по себе способен связывать флуороген и флуоресцировать. Оптимизации свойств N-фрагмента nanoFAST как флуоресцентной метки посвящена настоящая работа.

Abstract

During the development of a split-system based on the fluorogen-activating protein nanoFAST, it was found that its N-fragment, consisting of 87 amino acids, is capable of binding fluorogen and fluorescing by itself. This study is dedicated to optimizing the properties of the nanoFAST N-fragment as a fluorescent label.

Одним из перспективных направлений в области флуоресцентного мечения является применение комплексов флуорогенов и флуороген-активирующих белков. Флуорогены представляют собой молекулы, которые практически не флуоресцируют в свободном состоянии, однако демонстрируют интенсивную флуоресценцию при связывании с флуороген-активирующими белками. Значительную популярность в последние годы приобретает белок FAST (*Fluorescence-Activating and absorbtion-Shifting Tag*) и его варианты [1]. Он обладает меньшим по сравнению с зеленым флуоресцирующим белком размером (125 аминокислот, 14 кДа), не требует времени для созревания хромофора и присутствия кислорода в среде. Кроме того, этот белок демонстрирует повышенную устойчивость к фотообесцвечиванию благодаря возможности замещения поврежденной молекулы флуорогена новой. Флуорогенами для этого белка могут выступать соединения из группы арилиден-имидазолонов.

Ранее удалением 26 аминокислот с N-конца оригинального FAST в нашей лаборатории был получен его уменьшенный вариант, названный nanoFAST [2]. В процессе создания его сплит-варианта было показано, что N-концевой фрагмент белка, состоящий из 87 аминокислот тоже способен связывать флуороген арилиден-имидазолон HBR-DOM2 и флуоресцировать [3].

В ходе нашей работы мы оптимизировали условия случайного мутагенеза для внесения в среднем 3,75 замены в кодирующей последовательности белка, после чего методом Golden Gate по стандарту MoClo клонировали полученную последовательность в оптимизированную для проведения MoClo плазмиду pBAD. На среде LB с агаром с добавлением арабинозы для индукции синтеза белка и флуорогена HBR-DOM2 с помощью системы документирования ChemiDoc мы провели скрининг. Были проанализированы $1{,}5 \times 10^4$ колоний и отобраны 10 улучшенных вариантов, чья интенсивность флуоресценции превышала среднюю интенсивность флуоресценции изначального фрагмента не менее чем на 2 среднеквадратичных отклонения.

После проведения секвенирования по Сэнгеру и получения последовательностей мутированных вариантов (см. таблицу) мы получили модели структур белков при помощи нейросетевой модели AlphaFold (модель учи-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00013).

© Д. А. Мустафин, С. А. Краснова, М. С. Баранов, Ю. А. Богданова, 2025

тывала наличие глицин-серинового линкера GGSGGSGGS) и сравнили их со структурой nanoFAST, полученной при помощи ЯМР ранее [4].

Модель предсказывает смыкание бета-складок с N- и C-концов в параллельной укладке, образуя флуорофор-связывающий карман, при этом он обладает меньшим объемом по сравнению с nanoFAST, что может сказываться на активации флуоресценции флуорофора. Также в оригинальном фрагменте модель предсказывает отдаление остатка E46 (здесь и далее нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации полноразмерного FAST) от Y42 во внутреннем кармане. Взаимодействие этих остатков с молекулой HBR-DOM2 важно для активации флуоресценции. При этом удаления не наблюдается в трех из десяти полученных улучшенных вариантов белка (R2, R3, R6).

Было показано, что перспективными местами для внесения замен являются C- и N- концевые бета-складки, а также расположенные рядом с флуорофор-связывающим карманом I49 и V66, замены в которых встречаются в некоторых улучшенных вариантах. Мы провели насыщающий мутагенез по положениям 82 и 84–87, составляющим C-концевую бета-складку, но он не принес новых улучшенных вариантов (положение M83 было сохранено в силу важности его взаимодействия с флуорофором). Необходимо проведение дальнейших работ для проверки выдвинутых гипотез.

Аминокислотные замены, выявленные у улучшенных вариантов белка. Нумерация замен соответствует полноразмерному FAST

Мутантный вариант	Замены
R1	L33P, G69S, M95V, H108Y
R2	D34N, V66A
R3	K80E
R4	D36G, N43D, D53G, K78R, E93G, K110R
R5	I31V, L40P, I49T, F63I, T90R
R6	K110R
R7	G59D, N61D
R8	F75S, M95V, K106R
R9	I49F, E81G
R10	K111R

Литература

1. Plamont M.-A. et al. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo // Proc. Nat. Acad. Sci. 2016. Vol. 113. P. 497–502.

2. Mineev K. S. et al. NanoFAST: Structure-based design of a small fluorogen-activating protein with only 98 amino acids // Chem. Sci. 2021. Vol. 12. P. 6719–6725.

3. Baleeva N. S., Goncharuk M. V., Ivanov I. A. picoFAST: New Genetically Encoded Fluorescent Tag // Russ. J. Bioorg. Chem. 2025. Vol. 51. P. 721–728.

4. Lushpa V. A., Baleeva N. S., Goncharuk S. A. et al. Spatial Structure of NanoFAST in the Apo State and in Complex with its Fluorogen HBR-DOM2 // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. P. 11361.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-269

ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК НАЗАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВИЧНОЙ ЦИЛИАРНОЙ ДИСКИНЕЗИИ

APPLICATION OF NASAL EPITHELIAL CELL CULTURES IN THE DIAGNOSIS OF PRIMARY CILIARY DYSKINESIA

А. Г. Назарова[1], А. Г. Демченко[1], Т. А. Киян[1], О. П. Рыжкова[1], Е. Е. Брагина[1,2], Р. В. Вейко[1], С. А. Смирнихина[1], Е. И. Кондратьева[1]

[1]Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва
[2]НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

A. G. Nazarova[1], A. G. Demchenko[1], T. A. Kiyan[1], O. P. Ryzhkova[1], E. E. Bragina[1,2], R. V. Veiko[1], S. A. Smirnikhina[1], E. I. Kondratieva[1]

[1]N. P. Bochkov Research Center for Medical Genetics, Moscow
[2]Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University

✉ Ag.nazarova@mail.ru

Аннотация

Первичная цилиарная дискинезия (ПЦД) — труднодиагностируемое наследственное аутосомно-рецессивное (реже Х-сцепленное) заболевание. Диагностика ПЦД осложнена вторичными повреждениями респираторного эпителия вследствие инфекций или воспалений, приводящими к ложным результатам. Для повышения точности используют *in vitro* цилиогенез с последующим морфофункциональным анализом реснитчатых клеток.

Abstract

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a difficult-to-diagnose autosomal recessive (less commonly, X-linked) hereditary disease. The diagnosis of PCD can be complicated by secondary damage to the respiratory epithelium due to infection or inflammation, which can lead to undiagnosed or misdiagnosed cases. To address this issue, it has been proposed to perform ciliogenesis of respiratory epithelial cells *in vitro*, followed by analysis of the resulting ciliated cells.

Цель работы — получить банк клеток назального эпителия от пациентов с ПЦД или с подозрением на ПЦД и провести цилиогенез полученных клеток *in vitro* с последующей оценкой частоты биения ресничек (ЧБР).

Методы

Клетки респираторного эпителия выделяли из назальной браш-биопсии и банкировали в криохранилище. Цилиогенез клеток осуществляли методом ALI-культивирования в течение 24 дней, после чего проводили высокоскоростной видеомикроскопический анализ (ВВА) с оценкой ЧБР и иммунофлуоресцентное окрашивание на подтверждение наличия цилиарных клеток (β-тубулин).

Результаты

Получены и забанкированы культуры клеток респираторного эпителия от 15 пациентов с ПЦД или с подозрением на ПЦД. Результаты ЧБР после проведенного ВВА на ALI-культурах показали статистически значимое ($p < 0{,}0001$) снижение ЧБР у всех 15 пациентов ($5 \pm 2{,}7$ Гц) относительно здоровых доноров ($8{,}7 \pm 3{,}4$ Гц, $n = 5$). Иммунофлуоресцентное окрашивание подтвердило во всех полученных ALI-культурах наличие реснитчатых клеток.

Заключение

Результаты работы демонстрируют важность создания биобанка клеток назального эпителия и проведения цилиогенеза *in vitro*, что поможет в установлении диагноза ПЦД в сложных диагностических случаях.

© А. Г. Назарова, А. Г. Демченко, Т. А. Киян, О. П. Рыжкова, Е. Е. Брагина, Р. В. Вейко, С. А. Смирнихина, Е. И. Кондратьева, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-270

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ КИНАЗА CDK19 УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПЕРВИЧНЫХ МАКРОФАГАХ МЫШИ *

THE TRANSCRIPTIONAL KINASE CDK19 IS INVOLVED IN THE REGULATION OF IMMUNOMETABOLIC PROCESSES IN PRIMARY MOUSE MACROPHAGES

А. Н. Незнамов, Ю. П. Байкова, М. В. Кубекина

Институт биологии гена РАН, Москва

A. N. Neznamov, Y. P. Baykova, M. V. Kubekina

Institute of Gene Biology RAS, Moscow

✉ shura.neznamov.2016@gmail.com

Аннотация

CDK19 относится к транскрипционным киназам и участвует в перепрограммировании транскрипции — одного из ключевых механизмов дифференцировки клеток, а также развития патологических процессов. В рамках представленной работы показана роль киназы CDK19 в регуляции метаболизма липидов, фагоцитарной активности и иммунного статуса в первичных макрофагах мыши.

Abstract

CDK19 is a transcriptional kinase involved in transcription reprogramming — one of a key mechanisms of cell differentiation and the development of pathological processes. Within the presented study, the role of CDK19 kinase in regulating lipid metabolism, phagocytic activity, and immune status in primary mouse macrophages was demonstrated.

Атеросклероз — хроническое воспалительное заболевание сосудов, важную роль в развитии которого играет нарушение функции макрофагов вследствие дисрегуляции их липидного обмена [1]. Ключевым механизмом адаптации клеток к изменяющимся условиям является перепрограммирование транскрипции. CDK19 — важный участник этого процесса [2]. Работа проводилась в рамках исследования атерогенеза и сосредоточена на установлении роли киназы CDK19 в таких процессах, как накопление липидов макрофагами, их фагоцитарная активность и воспалительный статус.

Таким образом, целью данного исследования было оценить влияние транскрипционной киназы CDK19 на фагоцитарную активность, липидный обмен и воспалительный ответ в культуре BMDM-макрофагов мыши.

Для работы были использованы макрофаги мыши костномозгового происхождения (BMDM), выделенные из мышей линий C57BL/6 и Cdk19-/-. Костный мозг вымывали из берцовых костей исследуемых мышей. Затем клеточную суспензию культивировали в течение недели в присутствии колониестимулирующего фактора макрофагов M-CSF при 37 °C, 5 % CO2. За это время клетки дифференцировались в макрофаги.

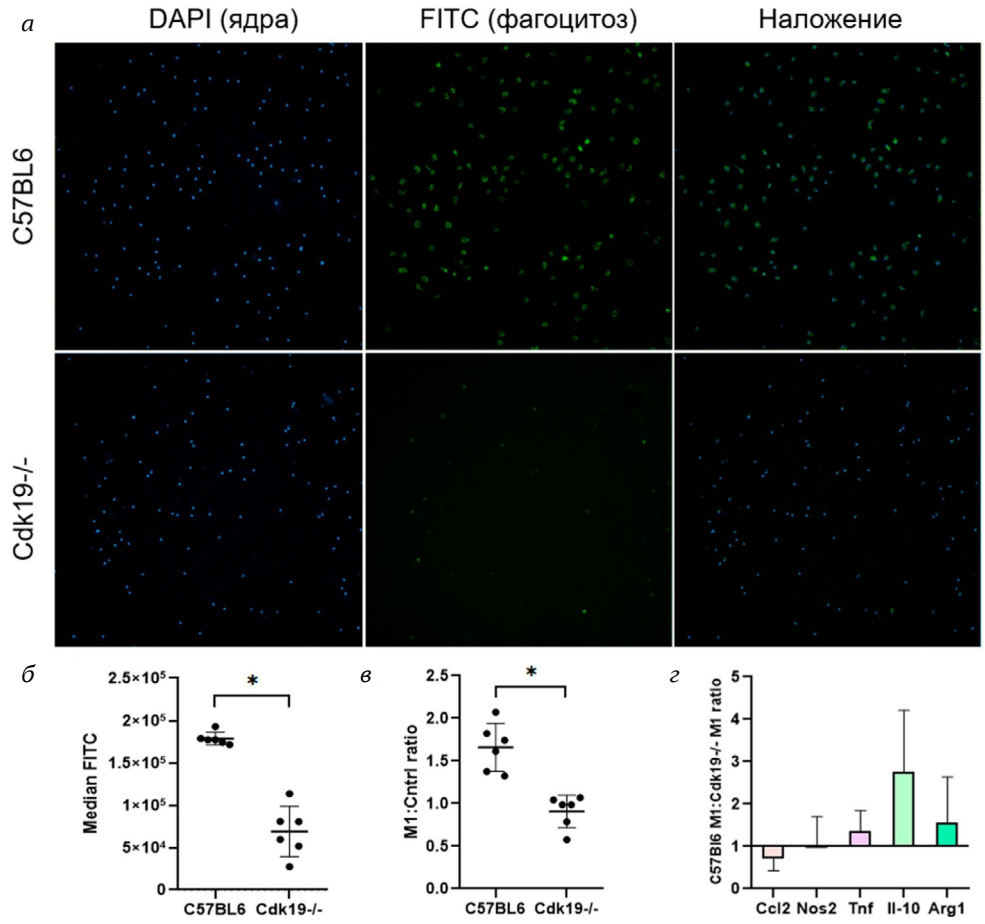
Для исследования фагоцитарной активности использовали флуоресцентно меченые частицы *E. coli* (Invitrogen), интенсивность флуоресценции которых значительно усиливается в кислой среде фаголизосом. После 4 ч инкубации с частицами при 37 °C проводили исследование фагоцитарной активности на проточном цитофлуориметре, а также дополнительно выполняли визуализацию процесса фагоцитоза методом флуоресцентной микроскопии. В результате было показано, что макрофаги с нокаутом *Cdk19* хуже, чем контрольные макрофаги, осуществляли фагоцитоз (см. рисунок, *а*, *б*), и эти различия достоверны ($p < 0,05$).

Известно, что в M1-поляризованных макрофагах происходит накопление липидов [3]. Следующим этапом работы было оценить накопление липидных включений макрофагами с нокаутом *Cdk19* при воспалительной M1-стимуляции. Для этого к дифференцированным макрофагам добавляли индукторы воспалительного ответа IFN-γ (20 ng/ml) и LPS (100 ng/ml), через 48 ч производили окрашивание липидных включений красителем LipidSpot (Biotium). Анализ производили на флуоресцентном микроскопе с последующей обработкой в программном обеспечении ImageJ. Оказалось, что в ходе воспалительного ответа макрофаги с нокаутом *Cdk19* накапливают меньше липидов по сравнению с контрольными макрофагами (см. рисунок, *в*), и эти различия достоверны ($p < 0,05$).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00384).

© А. Н. Незнамов, Ю. П. Байкова, М. В. Кубекина, 2025

На последнем этапе работы было проведено исследование влияния нокаута *Cdk19* на экспрессию про- и противовоспалительных генов при М1-поляризации макрофагов с помощью метода количественной ПЦР. Оказалось, что нокаут *Cdk19* не оказывает влияния на уровень экспрессии генов *Ccl-2*, *Tnf* и *Nos2* провоспалительного ответа макрофагов (см. рисунок, *г*), однако была обнаружена тенденция к снижению экспрессии противовоспалительных генов *Arg1* и *Il10*, что свидетельствует о возможном ухудшении переключения между М1- и М2-фенотипами макрофагов, но этот вопрос требует проведения дополнительных исследований.



Исследование фагоцитарной активности (*а*, *б*), накопления липидных включений (*в*) и уровня экспрессии про- и противовоспалительных маркеров (*г*) в культуре BMDM с нокаутом *Cdk19*

В представленной работе проведено комплексное исследование функциональных изменений в культуре BMDM мышей при нокауте гена *Cdk19*. Показано снижение фагоцитарной активности и накопления липидных включений в CDK19-дефицитных макрофагах по сравнению с контрольными макрофагами от мышей линии C57BL/6. Кроме того, в макрофагах от мышей линии Cdk19-/- показана классическая М1-поляризация с тенденцией к снижению экспрессии противовоспалительных генов *Il-10* и *Arg1*. Полученные данные свидетельствуют о критической роли CDK19 в регуляции как иммунных функций, так и метаболических процессов макрофагов, что открывает новые перспективы для понимания молекулярных механизмов иммунометаболизма.

Литература

1. Remmerie A., Scott C. L. Macrophages and lipid metabolism // Cell. Immunol. 2018. Vol. 330. P. 27–42.

2. Chen M., Li J., Zhang L. et al. CDK8 and CDK19: positive regulators of signal-induced transcription and negative regulators of Mediator complex proteins // Nucleic Acids Res. 2023. Vol. 51 (14). P. 7288–7313.

3. Morgan P. K., Huynh K., Pernes G. et al. Macrophage polarization state affects lipid composition and the channeling of exogenous fatty acids into endogenous lipid pools // J. Biol. Chem. 2021. Vol. 297 (6). P. 101341.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-271

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ РАЗВИТИЯ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ И ГУБЧАТОГО МИОКАРДА НА ПРИМЕРЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *TPM1* *

EXPLORATION OF MOLECULAR DETERMINANTS OF DILATED CARDIOMYOPATHY AND NON-COMPACT MYOCARDIUM DEVELOPMENT ON THE EXAMPLE OF MUTATIONS IN TPM1 GENE

В. В. Нефёдова[1], С. Ю. Клейменов[1,2], К. К. Лапшина[1,3], А. М. Матюшенко[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*
[2] *Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва*
[3] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

V. V. Nefedova[1], S. Y. Kleymenov[1,2], K. K. Lapshina[1,3], A. M. Matyushenko[1]

[1] *Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow*
[2] *Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow*
[3] *Lomonosov Moscow State University*

✉ victoria.v.nefedova@mail.com

Аннотация

Кардиомиопатии — это серьезные патологии миокарда. Было исследовано влияние мутаций гене *TPM1* на свойства сердечной (Tpm1.1) и цитоплазматической (Tpm1.7) изоформ тропомиозина. Замены E40K и L113V дестабилизируют молекулу Tpm. Замены E40K и E54K снижали способность Tpm к формированию концевых взаимодействий. Разрезающая/деполимеризующая активность кофилина-2 снижалась в присутствии Tpm1.1, мутации E40K и E54K не оказывали на это влияния.

Abstract

Cardiomyopathies are serious myocardial pathologies. The effect of mutations in *TPM1* gene on the properties and structure of cardiac (Tpm1.1) and cytoplasmic (Tpm1.7) isoforms of tropomyosin were studied. Substitutions E40K and L113V destabilized Tpm1.7 molecule. Substitutions E40K and E54K reduced the ability of Tpm to form end-to-end interactions. The severing/depolymerizing activity of cofilin-2 decreased in the presence of the Tpm1.1, the E40K and E54K mutations did not affect such properties.

Сердечно-сосудистые заболевания являются первой причиной смертности во всем мире и составляют порядка 32 % от всех смертей по данным ВОЗ. По современной классификации кардиомиопатии можно разделить на 5 типов: гипертрофическая, дилатационная (ДКМП), рестриктивная и аритмогенная кардиомиопатии, а также некомпактный миокард левого желудочка (НМЛЖ) или губчатый миокард. При исследовании генетически обусловленных кардиомиопатий обычно в центре внимания находятся саркомерные белки, напрямую обуславливающие возможность или невозможность нормального сокращения сердечной мышцы. Однако в случае с дилатационной кардиомиопатией и губчатым миокардом, вызванными мутациями в гене *TPM1*, есть предпосылки обратить внимание не только на регуляторную функцию Tpm, которая реализуется через изоформу Tpm1.1, экспрессирующуюся в саркомерах кардиомиоцитов, но и на его участие в формировании компартментов клетки и роль в ремоделировании актинового цитоскелета мышечной клетки за счет других изоформ, получаемых с гена *TPM1* в результате альтернативного сплайсинга. Tpm — это альфа-спиральный белок, формирующий coiled-coil структуру и способный образовывать полимерный тяж на поверхности актинового филамента. Для ДКМП и НМЛЖ были показаны генетические причины возникновения, среди которых мутации в гене *TPM1*, которые приводят к заменам E40K и E54K в изоформах, начинающихся с экзонов 1a2b и заменам L113V и D159N в изоформах, содержащих 3-й и 4-й экзоны. В связи с этим целью работы было изучение влияния мутаций в гене *TPM1* на свойства цитоплазматической изоформы Tpm1.7 и саркомерной изоформы Tpm1.1.

Вязкость растворов Tpm отображает концевые взаимодействия между димерами тропомиозина. Способность Tpm образовывать протяженный тяж может влиять в том числе и на свойства актинового филамента, которым он декорирован. В целом вязкость растворов Tpm1.7 отличается довольно высокими значениями относительно других изоформ Tpm. Замены E40K и E54K заметно (в два раза, 0,523 ± 0,032 для Tpm E40K и 0,570 ± 0,034 для Tpm E54K против 1,030 ± 0,041 мПа·с для белка дикого типа) снижали вязкость растворов Tpm1.7, что указывает на сниженную способность формировать междимерное взаимодействие. Замена L113V не оказывала влияния на способность Tpm1.7 образовывать филаменты.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00128).

© В. В. Нефёдова, С. Ю. Клейменов, К. К. Лапшина, А. М. Матюшенко, 2025

Структура белка была изучена методами дифференциально сканирующей калориметрии и спектроскопии кругового дихроизма. Для белка Tpm1.7 характерно наличие трех тепловых переходов при температурах 35,2, 44,2 и 51,4 °C, соответствующих центральному, C-концевому и N-концевому участкам структуры белка. У мутантной формы E40K были идентифицированы три перехода с T_m, равными 35,5, 41,9 и 47,6 °C. Для белка с аминокислотной заменой E54K температуры полупереходов составили 32,8, 40,8 и 51,8 °C, а для белка Tpm1.7 L113V они были равны 33,9, 42,8 и 46,5 °C. Таким образом, мутации E40K и L113V действительно более чем на 4 °C дестабилизируют N-концевой участок молекулы Tpm1.7. Обращает внимание и то, что все мутации так же на 2–3 °C дестабилизируют C-концевой домен и на 1–2 °C снижаются температуры полупереходов центральной части молекулы. Это указывает на дальнодействующие эффекты изменений в структуре, при которых изменения в одной части молекулы могут заметно влиять на другую.

Tpm принимает самое активное участие в регуляции перестройки актинового цитоскелета. Известно, что Tpm способен как защищать филамент актина от разборки, так и, напротив, привлекать «разрезающие» белки, например кофилин. Для исследования роли мутантных форм Tpm1.1 в регуляции динамики актинового цитоскелета был использован белок кофилин-2 (cof-2). Для оценки деполимеризующего и разрезающего действия кофилина нами был использован метод вискозиметрии. Добавление cof-2 приводило к снижению вязкости растворов как F-актина, так и актиновых филаментов, декорированных Tpm. Добавление Tpm1.1 увеличивало вязкость растворов актина, что может свидетельствовать о формировании более протяженных фибрилл в присутствии Tpm. Как белок Tpm1.1 дикого типа, так и две мутантные формы E40K и E54K обладали выраженным защитным действием и защищали актиновый филамент от действия cof-2.

Таким образом, мы предполагаем, что мутации E40K и E54K не оказывают влияния на «защитные» свойства Tpm в отношении воздействия кофилина.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-272

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ZMPSTE24 НА РЕПАРАЦИЮ ПО ПУТИ НЕГОМОЛОГИЧНОГО СОЕДИНЕНИЯ КОНЦОВ ИНДУЦИРОВАННЫХ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ ФИБРОСАРКОМЫ HT1080

THE EFFECT OF ZMPSTE24 INHIBITORS ON THE REPAIR OF INDUCED DNA DOUBLE-STRAND BREAKS IN HT1080 FIBROSARCOMA CELLS

В. Р. Осипова[1,2], С. В. Лаврушкина[2], И. И. Киреев[2]

[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
[2]НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

V. R. Osipova[1,2], S. V. Lavrushkina[2], I. I. Kireev[2]

[1]Lomonosov Moscow State University
[2]Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University

✉ osipova1910v@gmail.com

Аннотация

Ингибирование ZMPSTE24 лопинавиром и фозиноприлом приводит к изменениям в работе репарации путем негомологичного соединения концов, мешая нормальному восстановлению двухцепочечных повреждений ДНК, индуцированных этопозидом.

Abstract

Inhibition of ZMPSTE24 by lopinavir and fosinopril leads to changes in the repair process by non-homologous end joining, interfering with the normal repair of double-stranded DNA damage induced by etoposide.

Метастазирование опухолевых клеток является одной из ключевых проблем современной онкологии. Возможным вариантом борьбы с этим явлением может быть изменение механических свойств клеток с целью препятствия их миграции через плотный межклеточный матрикс. Для этого может быть применен подход изменения состава ядерной ламины с целью влияния на вязкоупругие свойства ядра, которое является лимитирующим фактором для мигрирующей клетки [1, 2]. Отношение преламина к зрелому ламину А меняет баланс между пластичностью и жесткостью ядра. Применение ингибиторов металлопротеазы ZMPSTE24, участвующей в посттрансляционных модификациях ламинов, приводит к увеличению прочности ядра, что мешает проникновению клеток через меньшие поры [3, 4]. Однако это может сопровождаться разрывами ядерной мембраны и, как следствие, механическим повреждением ДНК, в худшем случае приводя к двухцепочечным разрывам. Репарация данного вида повреждений может быть затруднена в связи с тем, что в условиях ингибирования ZMPSTE24 и, как следствие, накопления преламина, возможно, оказывается эффект на состояние хроматина и систем репарации, в частности на путь негомологичного соединения концов, белки которого в норме связаны с ламинами [5, 6]. Поэтому для понимания перспектив применения ингибиторов ZMPSTE24, лопинавира и фозиноприла необходимо не только оценить их прямую эффективность, но и понять характер оказываемого влияния на системы репарации ДНК, в особенности двухцепочечных разрывов, что и стало целью работы.

В настоящей работе были выбраны белки-маркеры репарации двухцепочечных разрывов — 53bp1 и γH2AX — для оценки динамики образования фокусов в условиях химической индукции повреждений этопозидом ингибиторов топоизомеразы II на клетках фибросаркомы человека HT1080.

Иммуноцитохимический анализ с непрямым мечением антителами обоих фокусов в фиксированных клетках показал, что при воздействии как лопинавира, так и фозиноприла начальный уровень двухцепочечных повреждений повышен, а после химической индукции разрывов число и площадь фокусов не возвращается к исходному столь же быстро, как в контрольных клетках.

Прижизненный анализ на клетках HT1080 с транзиентной трансфекцией для экспрессии меченного GFP белка 53bp1 позволил установить более сложный процесс изменения числа фокусов белка-маркера двухцепочечных разрывов. Во всех группах прослеживалось несколько разных паттернов изменения числа фокусов в ответ на повреждения, но в клетках, инкубированных с ингибиторами, менялось соотношение представителей каждого

© В. Р. Осипова, С. В. Лаврушкина, И. И. Киреев, 2025

паттерна фокусообразования, шло более активное накопление неразрешенных фокусов 53bp1, что свидетельствует о замедлении работы системы репарации по пути негомологичного соединения концов.

Для дальнейшего понимания влияния, оказываемого ингибиторами ZMPSTE24 на клетки, необходимо рассмотреть путь гомологичной рекомбинации, которая, возможно, позволит построить полную модель изменения динамики репарации двухцепочечных разрывов при этом виде терапии метастазирования.

Литература

1. Kalukula Y. et al. Mechanics and functional consequences of nuclear deformations // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. Vol. 23, No. 9. P. 583–602.

2. Yamada K. M., Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. Vol. 20, No. 12. P. 738–752.

3. Mehmood S. et al. Mass spectrometry captures off-target drug binding and provides mechanistic insights into the human metalloprotease ZMPSTE24 // Nat. Chem. 2016. Vol. 8, No. 12. P. 1152–1158.

4. Evangelisti C. et al. Lamin A and prelamin A counteract migration of osteosarcoma cells // Cells. 2020. Vol. 9, No. 3. P. 774.

5. Gonzalo S. DNA damage and lamins // Cancer biology and the nuclear envelope: recent advances may elucidate past paradoxes. 2014. P. 377–399.

6. Matralis A. N. et al. Molecular tools that block maturation of the nuclear lamin A and decelerate cancer cell migration // Bioorg. Med. Chem. 2018. Vol. 26, No. 20. P. 5547–5554.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-273

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТИАЗОЛОПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ В КОНТЕКСТЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ

INVESTIGATING THE INTERACTION OF THIAZOLOPYRIMIDINE DERIVATIVES WITH NUCLEIC ACIDS IN THE CONTEXT OF ANTICANCER ACTIVITY

Д. Е. Отводникова[1], Б. В. Папонов[2], С. А. Цымбал[1,2]

[1] *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[2] *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова*

D. E. Otvodnikova[1], B. V. Paponov[2], S. A. Tsymbal[1,2]

[1] *ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*

✉ otvodnikovadarya@yandex.ru

Аннотация

Разработка химиотерапевтических агентов с обратимым типом связывания нуклеиновых кислот позволит снизить повреждение здоровых клеток. В исследовании рассмотрены два вещества с подобной активностью — CYH и PZ27. Результаты показали, что оба вещества цитотоксичны, CYH обладает сродством как к ДНК, так и к РНК, при этом PZ27 преимущественно взаимодействует с ДНК и характеризуется отличающимся от CYH механизмом действия.

Abstract

The development of chemotherapeutic agents with reversible nucleic acid binding can help reduce damage to healthy cells. This study examines two compounds, CYH and PZ27, with such activity. The results show that the compounds are cytotoxic, CYH has affinity for DNA and RNA, whereas PZ27 predominantly interacts with DNA, exhibiting a mechanism of action distinct from that of CYH.

Введение

Применение химиотерапевтических агентов является надежным и эффективным способом борьбы с онкологическими заболеваниями. Несмотря на высокую эффективность в элиминации опухолевых клеток, такие агенты отличаются низкой селективностью и выраженной цитотоксичностью в отношении здоровых клеток [1]. Ковалентное, т. е. необратимое, связывание агента с ДНК является основной причиной выраженных побочных эффектов, возникающих вследствие повреждения здоровых клеток при применении традиционных химиотерапевтических агентов [2]. Поэтому разработка новых соединений, обратимо связывающих нуклеиновые кислоты и, соответственно, обладающих меньшими побочными эффектами на здоровые клетки, является актуальной задачей. В качестве таких агентов в исследовании выступают производные 4-(4-(диметиламино)стирил)-2-метил-6,7,8,9-тетрагидробензо[4,5]тиазоло-[3,2-a]пиримидин-5-ий перхлората: CYH и PZ27, содержащие кватернизованный атом азота и, предположительно, способные обратимо связывать как ДНК, так и РНК в клетке.

Цель работы — изучить механизм действия агентов CYH и PZ27, в частности определить характер их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК).

Материалы и методы

Место связывания вещества в клетке было определено с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентных красителей и фермента рибонуклеазы А. Цитотоксичность веществ оценивалась в резазуриновом и МТТ-тестах для культур опухолевых (K562, SK-MEL-2, HCT-116, SK-OV-3, HeLa) и неопухолевых (HPF, HS-5) клеток. Проточная цитофлуориметрия использовалась для измерения митохондриального потенциала, выявления распределения фаз клеточного цикла и определения характера гибели клеток под воздействием веществ.

Результаты

Минимальное значение IC50 вещества CYH было зафиксировано для меланомы и составило 0,17 мкМ, в то время как значение IC50 для линии фибробластов оказалось более чем на порядок выше и составило 4,23 мкМ. Вещество PZ27 проявляло более низкие значения IC50, чем CYH при прочих равных условиях. В резистент-

© Д. Е. Отводникова, Б. В. Папонов, С. А. Цымбал, 2025

ных моделях лейкоза и рака яичников, относительно нерезистентных, наблюдалось увеличение значения IC50 для обоих веществ. В клетках лейкоза (K562) под воздействием веществ не выявлено изменений клеточного цикла, тогда как клетки рака кишки (HCT-116) демонстрировали арест в фазе G2. В клетках рака шейки матки (HeLa) под воздействием CYH изменений митохондриального потенциала не наблюдалось. Преимущественный характер гибели клеток рака кишки под воздействием PZ27 — апоптотический.

В результате микроскопического исследования был выявлен гранулярный характер окрашивания цитоплазмы клетки веществом CYH, а также накопление этого вещества в ядрышках. При обработке клеток, окрашенных CYH, рибонуклеазой A наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции вещества CYH с сохранением гранулярного характера окрашивания. Вещество PZ27 окрашивало цитоплазму равномерно, накапливаясь в околоядерной области клетки, а также, аналогично CYH, в ядрышках. После обработки рибонуклеазой A интенсивность флуоресценции вещества PZ27 значимо не изменялась.

Выводы

Вещества CYH и PZ27 проявляют выраженное цитотоксическое действие для опухолевых клеток различного происхождения, причем вещество PZ27 более активно.

Вещество CYH обладает сродством как к ДНК, так и к РНК в клетке; гранулярный характер окрашивания может указывать на накопление вещества в митохондриях и, соответственно, на связывание с митохондриальной ДНК, что открывает новые области для его применения. Также вещество CYH, вероятно, обладает различными механизмами связывания при разных концентрациях. Вещество PZ27, скорее всего, имеет более высокое сродство к ДНК, чем к РНК.

Разработка и исследование подобных обратимо связывающих нуклеиновые кислоты агентов является важной и перспективной задачей для создания более селективных и менее токсичных химиотерапевтических средств.

Литература

1. Arshad N., Mir M. I., Perveen F. et al. Investigations on Anticancer Potentials by DNA Binding and Cytotoxicity Studies for Newly Synthesized and Characterized Imidazolidine and Thiazolidine-Based Isatin Derivatives // Molecules. 2022. Vol. 27, No. 2. URL: https://doi.org/10.3390/molecules27020354 (accessed: 21.07.2025).

2. Andrezálová L., Országhová Z. Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview // J. Inorg. Biochem. 2021. Vol. 225. URL: https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111624 (accessed: 21.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-274

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX* С ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ *

HIGH-MOLECULAR PROTEIN COMPLEXES OF THE SEA CUCUMBER *EUPENTACTA FRAUDATRIX* WITH PROTEASE ACTIVITY

А. И. Пашкова[1,2], С. Е. Соболева[2]

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

A. I. Pashkova[1,2], S. E. Soboleva[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ lactofer@mail.ru

Аннотация

В результате проведенных исследований были получены высокомолекулярные белковые комплексы разных органов и тканей голотурии *E. fraudatrix*, которые обладали протеазной активностью. Наиболее активные протеазы представлены в комплексах стенки тела и кишечника. Показано, что они являются сериновыми и металлопротеазами.

Abstract

As a result of the conducted studies, high-molecular protein complexes of different organs and tissues of the sea cucumber E. fraudatrix were obtained, which possessed protease activity. The most active proteases are presented in the complexes of the body wall and intestine. It was shown that they are serine and metalloproteases.

Голотурии или морские огурцы принадлежат к классу Holothuroidea и представляют собой уникальную группу морских беспозвоночных из типа Echinodermata (Иглокожие). Одной из особенностей голотурий является их способность к регенерации, которая позволяет им восстанавливать утраченные части тела [1]. В регенерации голотурий ключевую роль играют белки, они участвуют в различных аспектах восстановления, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку и морфогенез [2]. Показано, что у голотурии *E. Fraudatrix* (сем. Sclerodactylida, отр. Dendrochirotida) большую роль при регенерации играют протеазы пищеварительной системы [3]. Также в гомогенате голотурии *E. fraudatrix* был обнаружен высокомолекулярный стабильный белковый комплекс с протеазной и ДНК-гидролизующей активностями [4].

В связи с этим целью данной работы было выделение и исследование свойств белковых комплексов разных органов голотурии *E. fraudatrix*. Впервые из различных органов и тканей, таких как стенка тела, водные легкие, кишечник, гонады и целомическая жидкость, методом гель-фильтрации были выделены высокомолекулярные белковые комплексы с массами около 1,5 МДа, содержащие как минимум 3 (в гонадах) — 10 (в стенке тела) белков с массами от 10 до 280 кДа. Методом прямой зимографии было показано, что все полученные комплексы обладают протеазной активностью. Комплексы содержат от 3 до 8 протеаз с молекулярными массами 11–190 кДа, активных в широком диапазоне pH (4–10). Для большинства протеаз максимальная активность показана при pH 7,0, самые активные протеазы представлены в комплексах стенки тела и кишечника. Показано, что около половины протеаз — сериновые, меньшая часть металлопротеазы, которые активируются ионами Mg и Ca, а ингибируются Zn.

Поскольку показано, что металлопротеазы играют большую роль при перестройке внутриклеточного матрикса в течение процесса регенерации, то обнаруженные в составе комплексов металлозависимые протеазы могут вносить важный вклад в регенерацию органов голотурии *E. fraudatrix*. Кроме того, мультиферментные комплексы представляют собой примеры совершенной организации систем биохимических реакций, поскольку биологические свойства данных комплексов отличаются от функций отдельных белков, их составляющих. Поэтому изучение высокомолекулярных комплексов с протеазной активностью необходимо для фундаментального понимания роли белков при регенерации голотурий.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (№ 125012300658-9).

© А. И. Пашкова, С. Е. Соболева, 2025

Литература

1. Долматов И. Ю., Машанов В. С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука, 2007. 212 с.

2. Dolmatov I. Y. Molecular Aspects of Regeneration Mechanisms in Holothurians // Genes (Basel). 2021. Vol. 12 (2). P. 250.

3. Lamash N. E., Dolmatov I. Y. Proteases from the regenerating gut of the holothurian Eupentacta fraudatrix // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e58433.

4. Timofeeva A. M., Kostrikina I. A., Dmitrenok P. S. et al. Very Stable Two Mega Dalton High-Molecular-Mass Multiprotein Complex from Sea Cucumber Eupentacta fraudatrix // Molecules. 2021. Vol. 26. P. 5703.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-275

ТЕЛОМЕРЫ И ТЕЛОМЕРАЗА КАК ОНКОМАРКЕРЫ: ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА

TELOMERES AND TELOMERASE AS TUMOR MARKERS: POSSIBILITIES FOR CANCER DETECTION AND TREATMENT

М. И. Пчелинцев[1], А. А. Обозный[2], А. И. Глухов[1]

[1]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*
[2]*Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России*

M. I. Pchelintsev[1], A. A. Oboznyi[2], A. I. Glukhov[1]

[1]*Sechenov First Moscow State Medical University*
[2]*Stavropol State Medical University*

✉ michaelpchelintsev@mail.ru

Аннотация

Проведен биоинформатический анализ генов теломеразы (TERT, TERC), выявлены мутации и SNP, связанные с онкогенезом. Установлена высокая консервативность TERT, значимость промоторных мутаций и посттрансляционных модификаций. Полученные данные могут использоваться для диагностики и таргетной терапии рака.

Abstract

A bioinformatic analysis of telomerase genes (TERT, TERC) was conducted, revealing mutations and SNPs associated with oncogenesis. High TERT conservation, the significance of promoter mutations, and post-translational modifications were established. The results may aid in cancer diagnosis and targeted therapy.

Введение

Теломеры представляют собой концевые повторяющиеся нуклеотидные последовательности, играющие ключевую роль в поддержании геномной стабильности, предотвращая деградацию концов хромосом и их слияние. В нормальных соматических клетках активность теломеразы, рибонуклеопротеинового комплекса с ключевой каталитической субъединицей TERT и матричной РНК-компонентой TERC, подавляется, что приводит к постепенному укорачиванию теломер и ограничивает число делений [1]. В стволовых, половых и раковых клетках теломераза активируется, обеспечивая клеточное бессмертие. В частности, промоторные мутации C228T и C250T создают новые сайты связывания факторов ETS, приводя к гиперэкспрессии TERT и способствуя онкогенезу [2]. Актуальность исследования обусловлена необходимостью расширить понимание роли промоторных и других мутаций теломеразной активности в различных опухолевых процессах, а также разработать таргетные стратегии лечения.

Целью работы является комплексный биоинформатический и статистический анализ генов TERT и TERC с использованием данных международных баз для выявления и сравнительной характеристики мутационных профилей, оценки их эволюционного происхождения и клинической значимости, а также разработка алгоритмов для диагностики и терапии в рамках персонализированной онкологии.

Материалы и методы

Для анализа были собраны 106 промоторных нуклеотидных последовательностей гена TERT из баз данных NCBI GenBank, Ensembl, LOVD и dbSNP; дополнительно извлечены полные транскрипты и изоформы TERC из UniProt и Ensembl. Множественное выравнивание всех последовательностей выполнено ДПО UGENE с использованием алгоритма MUSCLE. Для филогенетического анализа применялся метод Neighbor Joining с моделью Kimura 2 Parameter (K2P) для расчета матрицы дистанций, и надежность узлов оценивали через 1000 bootstrap репликаций; ветви с поддержкой ⩾ 70 % считались статистически достоверными. Расстояния между последовательностями рассчитывались по p-distance с учетом только позиции без пропусков. Для визуализации генетической структуры SNP-профилей проведен анализ главных компонент на стандартизированной бинарной матрице наличия ключевых полиморфизмов. Связь обнаруженных мутаций с онкологическим фенотипом оценивали точным тестом Фишера с расчетом odds ratio и 95%-го доверительного интервала. Дополнительно изучался вклад

© М. И. Пчелинцев, А. А. Обозный, А. И. Глухов, 2025

однонуклеотидных полиморфизмов (TERT MNS16A, rs10069690, rs2736100, rs2853669) и посттрансляционных модификаций TERT (фосфорилирование, убиквитинирование) на функциональную активность фермента.

Результаты

Выравнивание продемонстрировало высокую консервативность каталитических доменов TERT: более 90 % идентичности во всех 106 образцах. Мутации C228T и C250T в промоторе встречались в 18 % случаев опухолевых образцов и ассоциировались с повышенной экспрессией теломеразы. Филогенетическое дерево NJ выявило три основных кластера: кластер hot spot C228T/C250T (bootstrap 92 %), группу редких мутаций IDs 28/71/162 (81 %) и группу IDs 165/167/168/179 (78 %). Средняя внутрикластерная p-distance варьировала от 0,015 до 0,022, межкластерные расстояния — от 0,028 до 0,035. PCA показал, что две первые компоненты объясняют 59,9 % общей дисперсии (PC1 38,2 %, PC2 21,7 %), четко разделяя hot spot и остальные изоляты. Тест Фишера подтвердил значимую связь C228T/C250T с опухолевым статусом (p = 0,004; OR = 4,8; 95 % CI 2,1–11,0). Анализ SNP выявил несколько полиморфизмов, статистически коррелирующих с риском: rs2736100 (интрон 2) и rs2853669 (промотор) показали наибольший вклад. Посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование TERT, обнаруживались преимущественно в образцах с C228T/C250T, что указывает на возможный механизм усиления активности фермента.

Выводы

Проведенный биоинформатический и статистический анализ подтвердил высокую клиническую значимость промоторных мутаций TERT как онкомаркеров и показал, что редкие полиморфизмы тоже могут влиять на активность теломеразы. Интеграция этих результатов в клиническую практику позволит повысить эффективность раннего выявления и таргетного лечения злокачественных опухолей.

Литература

1. Peka M. et al. Bioinformatic analysis of the effect of SNPs in the pig TERT gene on the structural and functional characteristics of the enzyme to develop new genetic markers of productivity traits // BMC Genomics. 2023. Vol. 24, No. 1. P. 487.

2. Powter B. et al. Human TERT promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2021. Vol. 147, No. 4. P. 1007–1017.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-276

ВЛИЯНИЕ ИЗОФОРМ STEP61 И STEP46 НА НОРМАЛЬНОЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И РЕГУЛЯЦИЮ BDNF/ERK/NMDA-СИГНАЛИНГА В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ *

THE EFFECT OF STEP61 AND STEP46 ISOFORMS ON THE NORMAL AND PATHOLOGICAL BEHAVIOR, AS WELL AS THE REGULATION OF BDNF/ERK/NMDA SIGNALING, IN THE HIPPOCAMPUS OF MICE

А. Я. Родный, К. П. Черендина, Д. В. Базовкина

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

A. Ya. Rodnyy, K. P. Cherendina, D. V. Bazovkina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ arodnyi@bionet.nsc.ru

Аннотация

Изучена роль изоформ STEP61 и STEP46 в регуляции поведения и нейропластичности. Сверхэкспрессия изоформ в гиппокампе мышей с нокаутом Ptpn5 выявила их функциональную специализацию: STEP61 регулирует NMDA-рецепторы и BDNF/TrkB-сигналинг, STEP46 влияет на ERK-каскад. Обе изоформы при сверхэкспрессии вызывают снижение двигательной активности, но различно влияют на стереотипное поведение и пространственную память.

Abstract

The role of STEP61 and STEP46 isoforms in behavior and neuroplasticity regulation was studied. Overexpression of isoforms in hippocampus of Ptpn5 knockout mice revealed their functional specialization: STEP61 regulates NMDA receptors and BDNF/TrkB signaling, STEP46 affects ERK cascade. Both isoforms when overexpressed reduce locomotor activity but differently affect stereotypic behavior and spatial memory.

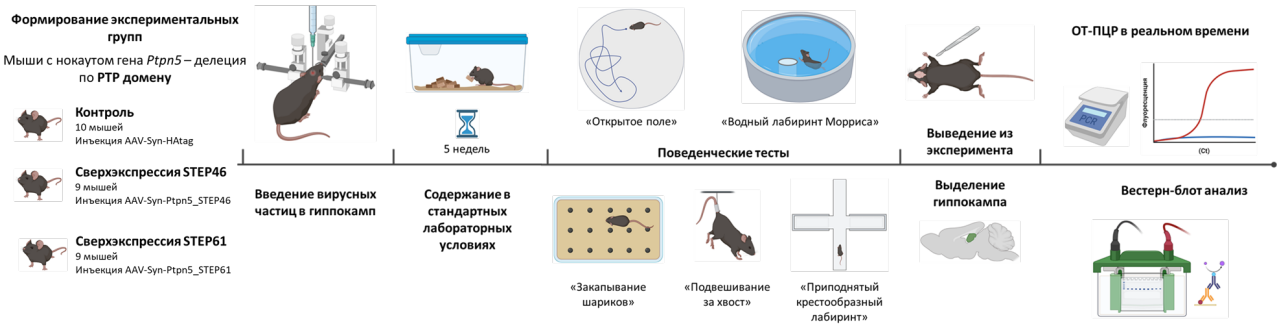
Аномалии передачи глутаматергических сигналов и нейротрофического сигнального пути BDNF-TrkB часто связывают с нарушениями когнитивных и эмоциональных функций при нейропсихиатрических расстройствах. Стриатумспецифичная протеинтирозинфосфатаза (STEP, кодируется геном *Ptpn5*) — нерецепторная тирозиновая фосфатаза, представленная во многих областях мозга двумя основными изоформами: STEP61 и STEP46. STEP регулирует синаптическую пластичность через дефосфорилирование NMDA-рецепторов и ERK1/2-киназы, что влияет на синаптическую передачу и внутриклеточную сигнализацию. Изменения активности STEP ассоциированы с различными нейропсихическими и нейродегенеративными заболеваниями. Различия в локализации и структуре STEP61 и STEP46 предполагают их специфические роли в регуляции нейропластичности и когнитивных функций, что открывает новые терапевтические перспективы. Несмотря на значительное количество работ, посвященных общему эффекту STEP, сравнительная роль изоформ в регуляции поведения и внутриклеточной передачи сигналов остается слабо изученной.

Цель исследования — изучение эффектов сверхэкспрессии изоформ STEP61 и STEP46 в гиппокампе мышей с нокаутом гена *Ptpn5* на различные виды поведения и молекулярные механизмы ERK/NMDA- и BDNF-сигналинга. Сверхэкспрессия каждой изоформы была достигнута с использованием аденоассоциированных векторов (AAV). Эксперименты проводили на самцах мышей, которые были разделены на три группы: STEP_KO (контрольная группа, введение AAV-Syn-HAtag), STEP46 (AAV-Syn-Ptpn6_STEP46) и STEP61 (AAV-Syn-Ptpn5_STEP61). Поведение оценивали в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «закапывание шариков», «подвешивание за хвост» и «водный лабиринт Морриса». Экспрессию генов в гиппокампе определяли методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени, уровни белков и их фосфорилирования — методом вестерн-блот анализа (см. рисунок). Статистическую обработку данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post hoc сравнением по Фишеру.

Поведенческий анализ показал, что экспрессия обеих изоформ STEP снижает двигательную активность мышей в тесте «открытое поле», при этом у STEP61 также значимо уменьшается время груминга. В тесте «закапывание шариков» группа STEP61 демонстрировала более выраженное стереотипное поведение по сравнению с STEP46 и контролем. В тесте «водный лабиринт Морриса» все группы успешно обучались по сравнению с первым днем, однако на пятый день теста только группы STEP_KO и STEP_61 показали пространственное предпо-

* Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта FWNR-2025-0021.

© А. Я. Родный, К. П. Черендина, Д. В. Базовкина, 2025



Дизайн эксперимента

чтение целевого сектора. Анализ экспрессии широкой панели генов, связанных с нейропластичностью, синаптической передачей и сигнальными путями, выявил значимые изменения только в экспрессии гена *Ntrk2* (кодирует TrkB рецептор) при сверхэкспрессии STEP61. Вестерн-блот анализ показал дифференциальное влияние изоформ на фосфорилирование ключевых сигнальных белков: STEP46 снижала уровень p-ERK1/2, тогда как STEP61 специфически уменьшала фосфорилирование NMDA-рецепторов по сравнению с другими группами.

Таким образом, впервые показана функциональная специализация изоформ STEP в регуляции поведения и синаптической пластичности. STEP61 преимущественно регулирует активность NMDA-рецепторов и BDNF/TrkB-сигналинг, тогда как STEP46 влияет на внутриклеточные каскады, включая MAPK/ERK и CREB-зависимую транскрипцию. Эти данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований роли изоформ STEP в нейропсихических заболеваниях, связанных с нарушением пластичности и когнитивных функций.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-277

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДОСТАВКИ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТЯЖЕЛОЦЕПОЧЕЧНОГО АНТИТЕЛА В СОСТАВЕ RAAV

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC CONSTRUCTIONS FOR DELIVERY AND EXPRESSION OF THE HEAVY CHAIN ANTIBODY GENE IN RAAV

Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, М. А. Довгий, Р. М. Хоссаин, Д. В. Щебляков, И. Б. Есмагамбетов

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, M. A. Dovgiy, R. M. Hossain, D. V. Shcheblyakov, I. B. Esmagambetov

N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ ryabovaei96@gmail.com

Аннотация

Применение рекомбинантных rAAV-векторов для доставки и длительной экспрессии генов нейтрализующих антител является перспективным направлением в разработке альтернативных стратегий профилактики инфекционных заболеваний. В ходе данного исследования были сравнены три конструкции rAAV, содержащие ген антитела B11-Fc, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа A. Продемонстрировано, что препарат rAAV-CMV-B11-Fc, содержащий промотор CMV, обеспечивает оптимальный уровень продукции антитела и защиту от ботулизма *in vivo*.

Abstract

The use of recombinant rAAV vectors for delivery and long-term expression of neutralizing antibody genes is a promising direction in the development of alternative strategies for the prevention of infectious diseases. In this study, three rAAV constructs containing the gene of the B11-Fc antibody, which neutralizes botulinum neurotoxin type A, were compared. It was demonstrated that the rAAV-CMV-B11-Fc preparation containing the CMV promoter provides an optimal level of antibody production and protection against botulism *in vivo*.

Введение

Пассивная генетическая иммунизация при помощи рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) является перспективной, так как обеспечивает доставку и длительную экспрессию генов нейтрализующих антител. На сегодняшний день ведутся исследования по применению rAAV-векторов для профилактики инфекционных заболеваний, вызываемых ВИЧ, вирусом Эбола, вирусом гриппа A, SARS-CoV-2, а также интоксикаций, вызванных ботулиническим нейротоксином [1–5]. Этот подход позволяет преодолеть ограничения пассивной иммунизации, связанные с необходимостью многократного введения препаратов моноклональных антител, из-за ограниченного периода циркуляции в организме.

Одним из ключевых факторов, определяющих эффективность пассивной генетической иммунизации, является дизайн rAAV-вектора. На экспрессию антител *in vivo* влияет не только серотип вируса, но и промотор с регуляторными элементами, форма генома вектора (одноцепочечный или самокомплементарный). Таким образом, оптимизация генетической конструкции позволяет достичь оптимального уровня продукции антитела в организме.

В настоящей работе мы провели сравнительный анализ эффективности трех вариантов rAAV серотипа DJ для доставки и экспрессии гена модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа A (BoNT/A).

Результаты

В рамках работы были получены три варианта rAAV-векторов серотипа DJ, экспрессирующих однодоменное антитело B11-Fc, нейтрализующее ботулинический нейротоксин типа A (BoNT/A): rAAV-CMV-B11-Fc, rAAV-CASI-B11-Fc, и scAAV-CMV-B11-Fc. Получение rAAV осуществляли в клетках HEK293, а очистку проводили с использованием тангенциальной фильтрации и аффинной хроматографии.

rAAV-CMV-B11-Fc представляет собой одноцепочечный вектор (ssAAV), содержащий CMV-энхансер, промотор CMV и hβG интрон. Вектор rAAV-CASI-B11-Fc имеет аналогичную форму генома, но отличается использованием композитного синтетического промотора CASI. Данный промотор включает CMV-энхансер, CAG-промотор, UbC интрон, а также регуляторный элемент WPRE, способствующий стабилизации и увеличению экспрессии

© Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, М. А. Довгий, Р. М. Хоссаин, Д. В. Щебляков, И. Б. Есмагамбетов, 2025

мРНК. Вектор scAAV-CMV-B11-Fc основан на самокомплементарной форме генома (scAAV). Его экспрессионная кассета включает промотор CMV и SV40 small T интрон.

Уровень экспрессии B11-Fc *in vitro* оценивали в клеточных линиях HEK293, CHO-S и C2C12 методом биослойной интерферометрии. Наибольшую продукцию антител в HEK293 и CHO-S обеспечивал вектор rAAV-CMV-B11-Fc, тогда как конструкция с промотором CASI демонстрировала повышенную экспрессию в миобластах C2C12.

Протективную активность всех трех вариантов оценивали на модели интоксикации ботулотоксином типа А у мышей. Однократное внутримышечное введение вариантов rAAV в дозе 10^{11} гк/животное обеспечивало полную защиту от летальной дозы 10 LD_{50} BoNT/A спустя 2 суток после введения, а защитный эффект сохранялся как минимум до 78 суток после введения. Конструкция rAAV-CMV-B11-Fc обеспечивала частичную защиту на первые сутки после введения, в то время как scAAV-CMV-B11-Fc демонстрировала высокую эффективность в ранние сроки, что подтверждает потенциальное применение для экстренной профилактики. Наиболее высокий уровень защиты против BoNT/A *in vivo* продемонстрировали конструкции rAAV-CMV-B11-Fc и rAAV-CASI-B11-Fc, обеспечивающие защиту на 78-е сутки против 1000 и 800 LD_{50} соответственно.

Полученные данные демонстрируют, что дизайн rAAV-вектора — включая форму генома и тип промотора — оказывает ключевое влияние на уровень экспрессии трансгена, длительность защитного эффекта. Конструкции rAAV-CMV-B11-Fc и rAAV-CASI-B11-Fc перспективны для длительной пассивной иммунизации. Вектор scAAV-CMV-B11-Fc может применяться в условиях, требующих ранней экспрессии и защиты в режиме экстренной профилактики.

Литература

1. Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B. et al. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type a prophylaxis // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13. P. 960937.

2. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A. et al. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 // Front. Immunol. — 2023. Vol. 14. P. 1129245.

3. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D. et al. Camelid VHHs fused to human fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin a in mice // Toxins. 2019. Vol. 11, No. 8. P. 464.

4. Nieto K., Salvetti A. AAV vectors vaccines against infectious diseases // Front. Immunol. 2014. Vol. 5. P. 5.

5. Ryabova E.I., Derkaev A.A., Pimenov N.V. et al. The Use of Recombinant Adeno-Associated Virus for Passive Immunization and Protection against Infectious Diseases // Mol. Genetics, Microbiol. Virology. 2024. Vol. 39, No. 1. P. 31–39.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-278

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ КОНЪЮГИРОВАННОГО С АЛЬБУМИНОМ НАНОРАЗМЕРНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ *

CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY OF ALBUMIN-CONJUGATED NANOCERIA

Е. А. Савинова[1], Е. В. Проскурнина[2,3], М. М. Созарукова[3],
Е. С. Ершова[2], Л. В. Каменева[2], Н. Н. Вейко[2], В. К. Иванов[3], С. В. Костюк[2]

[1]*Медицинский институт, Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва*
[2]*Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва*
[3]*Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва*

E. A. Savinova[1], E. V. Proskurnina[2,3], M. M. Sozarukova[3],
E. S. Ershova[2], L. V. Kameneva[2], N. N. Veiko[2], V. K. Ivanov[3], S. V. Kostyuk[2]

[1]*Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow*
[2]*Research Centre for Medical Genetics, Moscow*
[3]*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ savinova.ekaterina96@yandex.ru

Аннотация

Исследована цито- и генотоксичность конъюгированного с альбумином наноразмерного диоксида церия (CeO_2) на эмбриональных фибробластах легких человека. МТТ-тест показал безопасность комплекса до 1,6 мМ. Генотоксичность (8-oxo-dG, γH2AX) проявлялась через 3 ч, но снижалась к 24–72 ч благодаря активации репарации (BRCA1). Результаты подтверждают перспективность нано-CeO_2 для медицинского применения.

Abstract

The study evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of albumin-conjugated nanoceria (CeO_2) on human fetal lung fibroblasts. MTT assay demonstrated the safety of the complex up to 1.6 mM. Genotoxicity (8-oxo-dG, γH2AX) peaked at 3 h but decreased by 24–72 h due to activated DNA repair (BRCA1). Results confirm nanoceria's potential for biomedical applications.

Наноразмерный диоксид церия обладает уникальными биохимическими свойствами по отношению к активным формам кислорода и проявляет разнообразные ферментоподобные свойства, что позволяет его рассматривать как перспективный нанофармацевтический препарат [1]. В организме человека диоксид церия образует комплексы с одним из основных белков — альбумином [2]. Для оценки пользы и риска медицинского применения необходимо изучить токсичность комплексов альбумина с наночастицами диоксида церия *in vitro*. Эмбриональные фибробласты легких человека представляют собой широко используемую, надежную и чувствительную модель для исследования цито- и генотоксичности [3].

Для определения цитотоксичности использовали стандартный 72-часовой МТТ-тест, на основании которого выбрали концентрацию для дальнейших исследований. Для оценки генотоксичности конъюгаты наночастиц диоксида церия с альбумином в соотношении 1 : 1 (1,5 мкМ) культивировали с эмбриональными фибробластами легких человека в течение 1, 3, 24 и 72 ч. Генотоксичность оценивали по уровню 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-oxo-dG) как маркера окисления ДНК и фосфорилированных гистонов γH2AX как маркера двунитевых разрывов методом проточной цитометрии. Активность систем репарации оценивали по экспрессии белка BRCA1. Для оценки экспрессии белков использовали метод проточной цитометрии.

Результаты 72-часового МТТ-теста представлены на рис. 1, уровни 8-oxo-dG, γH2AX и белка BRCA1 относительно контроля при различных временах инкубации представлены на рис. 2.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что конъюгат диоксида церия с альбумином является безопасным для клеток в широком диапазоне концентраций вплоть до 1,6 мМ. Умеренная генотоксичность, вызванная окислительным повреждением, проявляется спустя 3 ч инкубации, после чего уровни маркеров снижаются до контрольных значений в течение 24 ч, ниже контрольных значений к 72 ч за счет активации систем репарации.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00088).

© Е. А. Савинова, Е. В. Проскурнина, М. М. Созарукова, Е. С. Ершова, Л. В. Каменева, Н. Н. Вейко, В. К. Иванов, С. В. Костюк, 2025

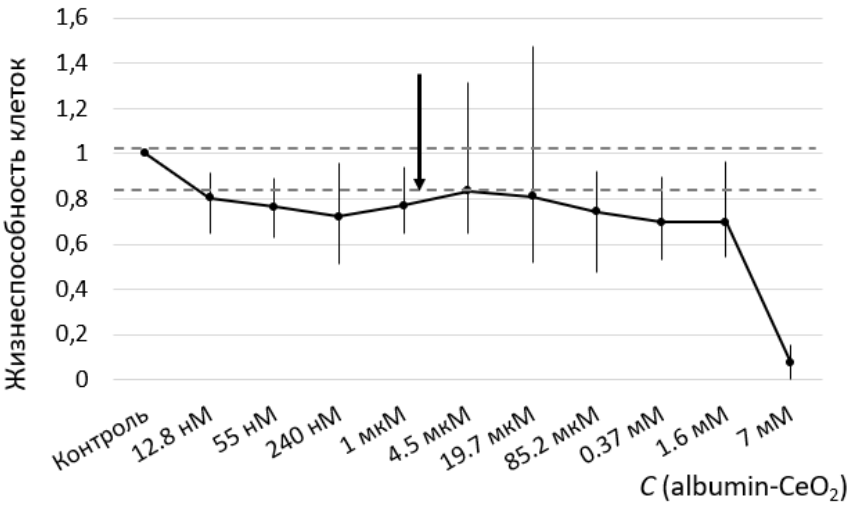


Рис. 1. Результаты МТТ-теста. *Пунктирная линия* обозначает границу, соответствующую выживаемости клеток 80 % и более. *По оси ординат* отложены значения МТТ-теста относительно контрольного образца (клетки, культивируемые без наночастиц). *Стрелкой* показана выбранная концентрация для исследования генотоксичности — 1,5 мкмоль/л

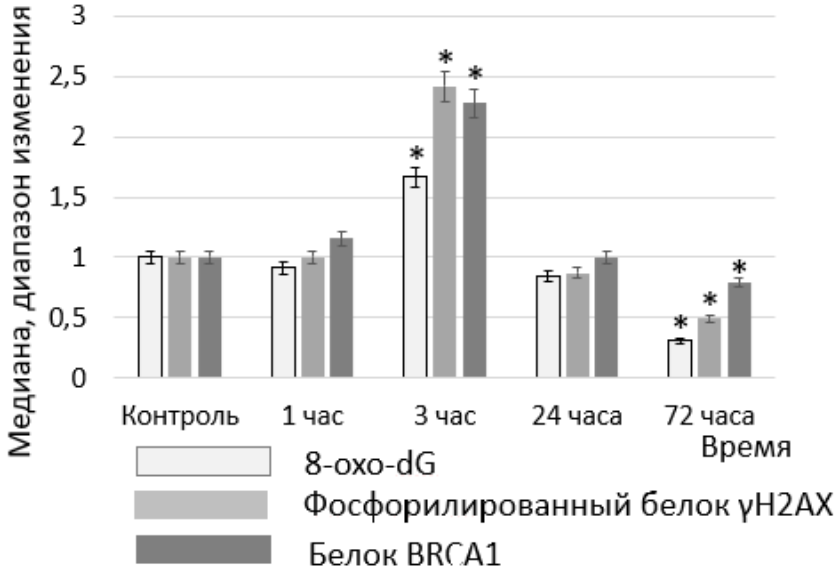


Рис. 2. Уровни 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (маркера окислительного повреждения ДНК), γH2AX (маркера двунитевых разрывов) и BRCA1 (маркера репарации) относительно контрольного образца. Значимые различия по критерию Манна — Уитни ($p < 0,05$) отмечены знаком *

Литература

1. Asati A., Santra S., Kaittanis C., Perez J. M. Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles // ACS Nano. 2010. Vol. 4, No 9. P. 5321–5331.

2. Walkey C. D., Olsen J. B., Song F. et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles // ACS Nano. 2014. Vol. 8, No 3. P. 2439–2455.

3. Miu B. A., Voinea I. C., Diamandescu L., Dinischiotu A. MRC-5 Human Lung Fibroblasts Alleviate the Genotoxic Effect of Fe-N Co-Doped Titanium Dioxide Nanoparticles through an OGG1/2-Dependent Reparatory Mechanism // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, No. 7. P. 6401.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-279

ПОКАЗАТЕЛЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ IL-1 НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ*

IL-1 RECEPTORS EXPRESSION INDEX ON IMMUNOCOMPETENT CELLS OF HEALTHY DONORS

Т. А. Савостьянова, Ю. В. Жукова, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

T. A. Savostyanova, J. V. Zhukova, J. A. Lopatnikova, S. V. Sennikov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ t.savostyanova@g.nsu.ru

Аннотация

В результате проведенного исследования для Т-лимфоцитов и моноцитов показано сочетание высокого процента клеток, экспрессирующих IL1R2 с высокой плотностью этого рецептора на клетках. Для пула CD4+-клеток и Т-хелперов памяти показано разнонаправленное сочетание процента клеток и плотности экспрессии обоих типов рецепторов. Для цитотоксических популяций разнонаправленное сочетание было характерно для общего пула CD8+-клеток и активированных клеток.

Abstract

The study showed a combination of a high percentage of cells expressing IL1R2 with a high density of this receptor on cells for T lymphocytes and monocytes. A multidirectional combination of the percentage of cells and the density of expression of both types of receptors was shown for the pool of CD4+ cells and memory T helpers. For cytotoxic populations, a multidirectional combination was characteristic of the total pool of CD8+ cells and activated cells.

Введение

Уровень экспрессии рецепторов на поверхности клеток напрямую влияет на функциональный ответ [1, 2]. При этом соотношение рецепторов определяет, какие сигнальные пути активируются [3]. IL-1 является плейотропным цитокином и принимает участие в большинстве иммуноопосредованных реакций как в норме, так и при патологии, поэтому изучение регуляторных механизмов, опосредованных цитокином и его рецепторами, является очень важным [4, 5]. В настоящее время наблюдается недостаток исследований относительно влияния уровней экспрессии рецепторов IL-1 на биологическую активность клеток. Поэтому целью исследования является оценка экспрессии и коэкспрессии рецепторов IL-1 на 12 субпопуляциях иммунокомпетентных клеток здоровых доноров.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования была использована кровь условно здоровых доноров. В исследование включено 11 мужчин (средний возраст 34,1) и 9 женщин (средний возраст 36,7). После подписания информированного согласия производился забор крови. Экспрессию рецепторов оценивали с помощью цитометрии. На начальном этапе производили выделение 12 субпопуляций иммунокомпетентных клеток: Т-лимфоциты (CD3+), В-лимфоциты (CD19+), моноциты (CD14+), Т-регуляторные клетки (CD4CD25highCD127low), общий пул CD4+ лимфоцитов, активированные Т-хелперные клетки (CD4CD25+), наивные Т-хелперные клетки (CD4CD45RA+), Т-хелперные клетки памяти (CD4CD45R0+), общий пул цитотоксических лимфоцитов (CD8+), активированные цитотоксические клетки (CD8CD25+), наивные цитотоксические клетки (CD8CD45RA), цитотоксические клетки памяти (CD8CD45R0). Далее, для каждой из выделенных популяций выделяли дубль-негативные клетки, дубль-позитивные клетки, IL1R1+-клетки и IL1R2+-клетки. В каждом образце оценивали относительное количество клеток с различным типом ко-экспрессии рецепторов. Также в этих же образцах записывали параметры интенсивности флюоресценции рецепторов для подсчета абсолютного количества рецепторов на клетках при помощи микросфер (Quantum™ Simply Cellular® (QSC) Bang Laboratories).

Результаты

При оценке коэкспрессии рецепторов статистически значимые различия получены при сравнении процента IL1R1+-клеток между Т-лимфоцитами и Т-регуляторными клетками (23,4 vs 10,9 соответственно p = 0,001)

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00120).

© Т. А. Савостьянова, Ю. В. Жукова, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников, 2025

и процента дубль-негативных клеток в популяции В-лимфоцитами и в популяциях моноцитов и Т-лимфоцитов (49,1 vs 14,8 и 16 $p < 0{,}0002$). Процент IL1R2+-клеток статистически значимо выше в популяции Т-лимфоцитов по сравнению с В-лимфоцитами. Процент IL1R1+-клеток был достоверно более высоким в общем пуле CD4+-клеток по сравнению с активированными Тх и популяцией клеток памяти (37,3; 41 vs 8,6; 8,5 $p < 0{,}0001$). Максимальный и статистически значимо более высокий по сравнению с остальными популяциями процент IL1R2+-клеток был характерен для активированных Т-хелперных клеток. Для активированных цитотоксических клеток характерен статистически значимо более высокий процент IL1R1+-клеток по сравнению с наивными клетками и клетками памяти. В свою очередь, для наивных и клеток памяти был характерен высокий процент дважды позитивных клеток, который и значимо отличался от общего пула CD8+-клеток и активированных цитотоксических клеток. Также значимые отличия обнаружены при сравнении процента дважды негативных клеток между общим пулом CD8+ клеток и клетками памяти.

При оценке абсолютного количества рецепторов для субпопуляций Т-хелперных клеток показано, что среднее количество рецепторов 1-го типа IL-1 на Т-хелперных клетках памяти статистически достоверно выше по сравнению с этими показателем в популяции общего пула CD4+ клеток и наивных Т-хелперных клеток. В субпопуляциях цитотоксических лимфоцитов количество рецепторов 2-го типа значимо не отличалось, а среднее число рецепторов 1-го типа IL-1 было значимо ниже на активированных клетках CD8+CD25+ по сравнению с уровнем экспрессии на наивных и клетках памяти.

Таким образом, в результате проведенного исследования для Т-лимфоцитов и моноцитов было показано сочетание высокого процента клеток, экспрессирующих IL1R2 с высокой плотностью этого рецептора на клетках. Для общего пула CD4+-клеток и Т-хелперов клеток памяти показано разнонаправленное сочетание процента клеток и плотности экспрессии рецепторов как первого, так и второго типа. Для цитотоксических популяций разнонаправленное сочетание было характерно для общего пула CD8+-клеток и активированных клеток. Полученные данные послужат группой сравнения для дальнейших исследований экспрессии и коэкспрессии рецепторов IL-1 при различных заболеваниях и для оценки функционального ответа клеток на действие цитокина.

Литература

1. Naudé P. J., den Boer J. A., Luiten P. G., Eisel U. L. Tumor necrosis factor receptor cross-talk // FEBS J. 2011. Vol. 278, No. 6. P. 888–98.

2. Fotin-Mleczek M., Henkler F., Samel D. et al. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: tNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8 // J. Cell Sci. 2002. Vol. 115. P. 2757–2770.

3. Dinarello C. A. Introduction to the interleukin-1 family of cytokines and receptors: Drivers of innate inflammation and acquired immunity// Immunol. Rev. 2018. Vol. 281. P. 5–7.

4. Mantovani A., Dinarello C. A., Molgora M., Garlanda C. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity // Immunity. 2019. Vol. 50. P. 778–95.

5. Cai Y., Xue F., Quan C. et al. Critical Role of the IL-1β-IL-1R Signaling Pathway in Skin Inflammation and Psoriasis Pathogenesis // J. Invest. Dermatol. 2019. Vol. 139, No. 1. P. 146–156.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-280

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ОСТРУЮ ГИПОКСИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ У ЖИВОТНЫХ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К НЕДОСТАТКУ КИСЛОРОДА*

MOLECULAR BIOLOGICAL FEATURES OF REACTION TO ACUTE HYPOXIC EFFECTS IN ANIMALS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO OXYGEN DEFICIENCY

М. В. Силина[1], Д. Ш. Джалилова[1,2], И. С. Цветков[1], О. В. Макарова[1]

[1] *Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва*
[2] *Медицинский университет Петровского, Москва*

M. V. Silina[1], D. Sh. Dzhalilova[1,2], I. S. Tsvetkov[1], O. V. Makarova[1]

[1] *Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow*
[2] *Petrovsky Medical University, Moscow*

✉ marusyasilina99@yandex.ru

Аннотация

Реакция на острую гипоксическую нагрузку у животных с низкой устойчивостью к гипоксии характеризуется изменениями в органах-мишенях гипоксии и активацией провоспалительного ответа по сравнению с высокоустойчивыми животными.

Abstract

The response to acute hypoxic exposure in susceptible to hypoxia animals is characterized by changes in hypoxic target organs and activation of the proinflammatory response compared to tolerant animals.

Гипоксия является неотъемлемым компонентом многих патологических процессов в организме, включая воспаление и опухолевый рост. Проблема адаптации к гипоксии, ее роль в развитии различных заболеваний долгие годы изучается на моделях животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода [1–4]. Одним из подходов, направленных на повышение устойчивости организма к инфекциям, является воздействие острой гипоксической нагрузкой (ОГН). Однако данные о ее влиянии на морфофункциональное состояние внутренних органов и динамику уровней экспрессии регуляторных генов в зависимости от исходной устойчивости организма к гипоксии в литературе не представлены.

Цель работы — установить молекулярно-биологические особенности адаптации к ОГН у животных с высокой и низкой устойчивостью к недостатку кислорода.

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс Вистар в возрасте 2–3 мес. (n = 64). По «времени жизни» (ВЖ) до принятия бокового положения на критической «высоте» (11 500 м) животных разделили на высокоустойчивых (ВУ, n = 13, ВЖ > 240 с) и низкоустойчивых (НУ, n = 22, ВЖ < 80 с) к гипоксии. Через месяц моделировали ОГН (7000 м, 1 ч) в барокамере, после чего животных выводили из эксперимента. Проводили морфологическое и морфометрическое исследование легких, почек, тимуса и селезенки, а также методом ПЦР в реальном времени оценивали уровни экспрессии мРНК *Hif1a*, *Epas1*, *Hif3a*, *Nfkb*, *Il1b*, *Tnfa* и *Tgfb* в лейкоцитах периферической крови. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Характер распределения показателей определяли по критерию Колмогорова — Смирнова. Поскольку данные были распределены ненормально, достоверность различий между показателями определяли с помощью непараметрических критериев Манна — Уитни, Крускала — Уоллиса и Данна. Данные выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25–75 %). Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

После ОГН в легких как ВУ, так и НУ к гипоксии крыс выявлен очаговый периваскулярный и интраальвеолярный отек, однако только у ВУ обнаружено увеличение количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Только у НУ к гипоксии крыс после воздействия в почках выявлена гиалиново-капельная и зернистая дистрофия извитых канальцев. После ОГН в тимусе у НУ к гипоксии животных обнаружена картина «звездного неба» с гибелью тимоцитов, в то время как у ВУ — гиперплазия коркового вещества. Также после ОГН у НУ к гипоксии крыс отмечалось увеличение уровней экспрессии *Hif3a* и снижение *Nfkb* и *Tgfb*, а у ВУ — увеличение

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-15-00117).

© М. В. Силина, Д. Ш. Джалилова, И. С. Цветков, О. В. Макарова, 2025

Epas1. При этом уровни экспрессии *Hif3a* и *Tnfa* были статистически значимо выше у НУ к гипоксии животных после ОГН по сравнению с ВУ.

Таким образом, ОГН приводит к активации провоспалительного ответа, а также к морфологическим изменениям в чувствительных к гипоксии органах — легких и почках, в органах иммунной системы — тимусе и селезенке, которые более выражены у НУ к недостатку кислорода животных.

Литература

1. Esper A.M. et al. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis // Crit. Care Med. 2006. Vol. 34. P. 2576–2582.

2. Mayr F. B. et al. Epidemiology of severe sepsis // Virulence. 2014. Vol. 5. P. 4–11.

3. Kosyreva A. M. et al. Age-Specific Features of Hypoxia Tolerance and Intensity of Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammatory Response in Wistar Rats // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. Vol. 166. P. 699–703.

4. Dzhalilova D. S. et al. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats // J. Inflammation Res. 2019. Vol. 12. P. 73–86.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-281

УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ МРНК И МИКРОРНК В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КАК БИОМАРКЕРЫ ИСХОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ГИПОКСИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ *

MOLECULAR BIOLOGICAL FEATURES OF ADAPTATION TO ACUTE HYPOXIC EFFECTS IN ANIMALS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO OXYGEN DEFICIENCY

М. В. Силина[1], Д. Ш. Джалилова[1,2], В. М. Кириллов[3], О. В. Макарова[1]

[1]Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва
[2]Медицинский университет Петровского, Москва
[3]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

M. V. Silina[1], D. Sh. Dzhalilova[1,2], V. M. Kirillov[3], O. V. Makarova[1]

[1]Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow
[2]Petrovsky Medical University, Moscow
[3]Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

✉ marusyasilina99@yandex.ru

Аннотация

Уровни экспрессии мРНК и микроРНК, регулирующих клеточный ответ на гипоксию и воспаление, являются биомаркерами исходной устойчивости к гипоксии — низкоустойчивые организмы имеют высокий провоспалительный потенциал, характеризующийся высокими уровнями экспрессии *Hif1*, *Epas1*, *Hif3a* и *Nfkb* и низкими *rno-miR-155-3p* и *rno-miR-210-3p* в лейкоцитах периферической крови по сравнению с высокоустойчивыми.

Abstract

The expression levels of mRNA and microRNA regulating the cellular response to hypoxia and inflammation are biomarkers of initial resistance to hypoxia — susceptible organisms have a high proinflammatory potential, characterized by high *Hif1*, *Epas1*, *Hif3a* and *Nfkb* and low *rno-miR-155-3p* and *rno-miR-210-3p* expression levels in peripheral blood leukocytes compared to tolerant.

Главную роль в реакции на гипоксию играют транскрипционные факторы HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*), активность которых регулирует большое количество молекул, в том числе микроРНК [1]. Известно, что организмы различаются по исходной устойчивости к недостатку кислорода, наиболее распространенным способом определения которой является воздействие сублетальной гипоксической нагрузки (СГН) в барокамере, которое может приводить к альтеративным изменениям во внутренних органах. Поэтому требуется разработка быстрых и точных способов оценки устойчивости к гипоксии, одним из которых может быть определение экспрессии мРНК и микроРНК, регулирующих клеточный ответ на недостаток кислорода и воспаление, в лейкоцитах периферической крови.

Цель работы — исследовать уровни экспрессии микроРНК и генов, регулирующих клеточный ответ на гипоксию и воспаление, в лейкоцитах периферической крови у лабораторных животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода.

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс Вистар в возрасте 2–3 мес. (n = 30). У животных, не подвергавшихся гипоксической нагрузке, забирали 1 мл крови из хвостовой вены в пробирки с К3-ЭДТА, лизировали эритроциты и добавляли фиксатор РНК для длительного хранения. Через месяц определяли устойчивость крыс к СГН на критической «высоте» (11 500 м) однократно в барокамере по «времени жизни» до принятия бокового положения и появления признаков асфиксии. Было выделено 2 группы крыс: высокоустойчивые (ВУ, n = 6) с «временем жизни» более 240 с и низкоустойчивые (НУ, n = 6) с «временем жизни» менее 80 с. Экспрессию мРНК *Hif1a, Epas1, Hif3a, Arnt, Vegf, Epo, Egln1, Nfkb, Il1b, Tnfa, Tgfb* и микроРНК *rno-miR-210-5p, rno-miR-210-3p, rno-miR-107-5p, rno-miR-107-3p, rno-miR-145-5p, rno-miR-145-3p, rno-miR-155-5p, rno-miR-155-3p* в клетках крови определяли методом ПЦР в реальном времени. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Поскольку данные были распределены ненормально, досто-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00061).
© М. В. Силина, Д. Ш. Джалилова, В. М. Кириллов, О. В. Макарова, 2025

верность различий между показателями определяли с помощью непараметрических критериев Манна — Уитни, Крускала — Уоллиса и Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

До воздействия СГН у НУ к гипоксии животных по сравнению с ВУ уровни экспрессии мРНК *Hif1a*, *Epas1, Hif3a* и *Nfkb* были статистически значимо выше. В то же время уровни экспрессии *rno-miR-155-3p* и *rno-miR-210-3p* у НУ к гипоксии животных были ниже, чем у ВУ. Исходный высокий уровень экспрессии *Hif1a* и *Nfkb* у НУ к недостатку кислорода крыс может свидетельствовать о высоком провоспалительном потенциале у этих животных, так как в литературе подробно охарактеризована взаимосвязь клеточных ответов на гипоксию и воспаление, в частности взаимодействие транскрипционных факторов NF-κB и HIF-1α [2]. Мишенью miR-210 являются транскрипты белков ISCU1 и ISCU2 (*Iron-Sulfur Cluster assembly proteins*), основная роль которых — обеспечение транспорта электронов и окислительно-восстановительных реакций в метаболизме различных молекул [3]. Высокий уровень экспрессии *rno-miR-210-3p* у ВУ к гипоксии крыс может свидетельствовать о подавлении трансляции ISCU1 и ISCU2, следствием чего является снижение активности митохондриального дыхания и смещение баланса между окислительным фосфорилированием и гликолизом в сторону последнего, что приводит к формированию устойчивости к недостатку кислорода.

Полученные данные об уровнях экспрессии мРНК и микроРНК в лейкоцитах периферической крови послужат основой для разработки способа определения устойчивости к гипоксии у животных и людей.

Литература

1. Silina M. V. et al. Role of microRNAs in regulation of cellular response to hypoxia // Biochem. Moscow. 2023. Vol. 88. P. 741–757.

2. van Uden P. et al. Evolutionary conserved regulation of HIF-1β by NF-κB // PLoS Genetics. 2011. Vol. 7. P. e1001285.

3. Chan S. Y. et al. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2 // Cell Metabolism. 2009. Vol. 10. P. 273–284.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-282

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ И РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА *

DETERMINATION OF THE AMINO ACID SEQUENCE AND DEVELOPMENT OF A PRODUCER FOR THE MUTANT VARIANT OF HIV-1 PROTEASE CIRCULATING IN THE SIBERIAN FEDERAL DISTRICT

В. О. Труфанов, С. В. Беленькая

Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

V. O. Trufanov, S. V. Belenkaya

Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ trufano8@mail.ru

Аннотация

В мире зарегистрировано около 38 млн людей, живущих с ВИЧ, более 1,4 млн — в России. Антиретровирусная терапия позволяет контролировать развитие заболевания, но из-за высокой изменчивости возникают субтипы вируса [1], устойчивые к существующим лекарствам. Выявлены мутантные формы PRS17 и PRS5B, резистентные к клиническим ингибиторам протеазы ВИЧ-1 [2], что обусловливает необходимость дальнейшего мониторинга циркулирующих субтипов ВИЧ-1.

Abstract

Approximately 38 million people worldwide are living with HIV, with over 1.4 million cases registered in Russia. The use of antiretroviral therapy controls disease progression, but high variability of HIV-1 leads to new viral subtypes [1], some of which exhibit resistance to medications. Mutant forms PRS17 and PRS5B have been identified as resistant to clinical protease inhibitors [2] underscoring the need for monitoring circulating HIV-1 subtypes.

Цель работы — установить нуклеотидные и аминокислотные замены последовательности протеазы ВИЧ-1 в образцах, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа, а также получить штаммы-продуценты и разработать протокол выделения и рефолдинга мутантного варианта протеазы ВИЧ-1.

Для достижения поставленной цели были взяты 267 образцов вирусной РНК (предоставлены лабораторией иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), выделенных из сывороток крови людей, зараженных ВИЧ и проживающих на территории Сибирского федерального округа. Для амплификации нуклеотидной последовательности протеазы ВИЧ-1 проводили ОТ-ПЦР на матрице вирусной РНК ВИЧ- с использованием праймеров HIV-F (5′-aaaaaaggatccagtggttttagaaaaatggcattcc-3′), HIV-R (5′-aaaaaagcggccgcttaaccgctaccaccgctctgaaaggtaacaccgctacactg-3′). Полученные последовательности были проанализированы на наличие нуклеотидных и аминокислотных замен.

После выявления характерных аминокислотных замен последовательности протеазы ВИЧ-1, представленной на территории Сибирского федерального округа, ее нуклеотидная последовательность была оптимизирована под экспрессию в системе *E. coli* и клонирована по методу Гибсона в составе экспрессионного вектора pET28-HIV, синтезирующего белок SUMO и рекомбинантную протеазу ВИЧ-1 в единой рамке считывания. Амплификацию вектора и последовательности синтезированной протеазы ВИЧ-1 проводили с использованием праймеров pET28-F/pET28-R (5′-TGATAACTCGAGCACCACCAC -3′/5′- GCCACCAATCTGCTCACGATG -3′) и SUMO-HIV-F/SUMO-HIV-R (5′ TGAGCAGATTGGTGGCCCGCAGATTACCCTGTGGAAAC -3′/5′- GTGGTGCTCGAG TTATCAAAAGTTCAGGGTTGCACCAATCT -3′) соответственно. В результате был получен вектор pET28-HIV. Так же была получена плазмида, содержащая глицин-сериновый линкер между белком SUMO и рекомбинантной протеазой ВИЧ-1, — pET28 _GS_HIV.

Посредством трансфекции клеток *E. Coli* BL21 codon plus описанными плазмидами были получены штаммы-продуценты мутантной формы вирусной протеазы. Был произведен сравнительный анализ способности полученных белков к рефолдингу и переходу в функциональную форму. Анализ показал, что белок, полу-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-75-00117).
© В. О. Труфанов, С. В. Беленькая, 2025

ченный из продуцентов, трансформированных плазмидой pET28-HIV и pET28 _GS_HIV, подвергается рефолдингу, переходя в растворимую форму. Однако штамм, трансформированный плазмидой pET28-HIV, в отличие от штамма, трансформированного плазмидой pET28 _GS_HIV, не образует зрелую протеазу при обработке протеазой SUMO.

Литература

1. Buonaguro L., Tornesello M. L., Buonaguro F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in theworld-wide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications // J. Virology. 2007. Vol. 81, No. 19. P. 10209–10219.

2. Park J. H. et al. Binding of clinical inhibitors to a model precursor of a rationally selected multidrug resistant HIV-1 protease is significantly weaker than that to the released mature enzyme // Biochem. 2016. Vol. 55, No. 16. P. 2390–2400.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-283

ПОЛУЧЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО ГЕН ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО КАТЕЛИЦИДИНА

OBTAINING AN ADENOVIRUS VECTOR CARRYING THE HUMAN CATHELICIDIN GENE

В. С. Угрюмов[1,2], Р. З. Прусаков[1,2], В. М. Вахтинский[2]

[1] *Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва*
[2] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва*

V. S. Ugriumov[1,2], R. Z. Prusakov[1,2], V. M. Vakhtinskii[2]

[1] *Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow*
[2] *N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow*

✉ ugriumovviacheslav@mail.ru

Аннотация

Антимикробные пептиды (АМП) — перспективная альтернатива антибиотикам в условиях глобального кризиса устойчивости патогенов. В настоящей работе мы получили аденовирусный вектор, несущий ген АМП кателицидина (hCAMP), активной формой которого является LL-37.

Abstract

Antimicrobial peptides (AMP) are a promising alternative to antibiotics in the context of the global pathogen resistance crisis. In this work, we have obtained an adenoviral vector carrying the AMP cathelicidin (hCAMP) gene, the active form of which is LL-37.

Введение

В 2019 г. антибиотикорезистентные патогенные микроорганизмы стали причиной 1,27 млн смертей и способствовали 4,95 млн смертей [1]. Антимикробные пептиды (АМП) являются перспективной альтернативой антибиотикам на фоне глобального кризиса антибиотикорезистентности патогенов. АМП LL-37 — представитель семейства кателицидинов человека обладает широким спектром антимикробной активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий, поскольку, являясь амфифильной молекулой, внедряется и нарушает целостность бактериальных мембран. Прямое введение LL-37 в организм ограничено коротким периодом полураспада *in vivo* и потенциальной цитотоксичностью при использовании высоких доз [2].

В качестве решения предлагается применение аденовирусных векторов для доставки гена LL-37, поскольку Ad-вектор обладает высокими эффективностью трансдукции и экспрессией трансгена, широким тропизмом, оптимальным периодом экспрессии, способностью инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки.

Целью работы являлась разработка аденовирусного вектора, несущего ген кателицидина (hCAMP), активной формой которого является LL-37.

Ход работы

Исходя из данных о последовательности гена hCAMP, синтезированы 12 олигонуклеотидов, каждый из которых имеет концевые комплементарные участки с соседними. С помощью полимеразной цепной реакции с перекрывающимся концевыми участками (*overlap extension polymerase chain reaction*, далее OE-PCR) синтезированы три промежуточных продукта, которые затем сшиты OE-PCR (рис. 1). В результате получена последовательность 581 п. о., содержащая ген кателицидина и имеющая комплементарные с шаттл-вектором pCD515-mcherry концы.

С помощью метода сборки Гибсона осуществлено клонирование последовательности с геном кателицидина в pCD515-mcherry (рис. 2).

Полученный pCD515-LL-37 трансформировали в *E. coli* тепловым шоком. Из клонов выделена плазмидная ДНК и проанализирована методом рестрикционного анализа. Положительные клоны отправлены на секвенирование по Сэнгеру, по данным которого отобран необходимый клон.

Для получения аденовирусного вектора плазмиду pCD515-LL-37 и плазмидный аденовирусный вектор pBHG с делециями E1 и E3 котрансфицировали в HEK293. Благодаря наличию FRT-сайтов в обеих плазмидах

© В. С. Угрюмов, Р. З. Прусаков, В. М. Вахтинский, 2025

и из-за экспрессии FLP-рекомбиназы из pBHG участок pCD515-LL37, содержащий левый ITR, сигнал инкапсидации и экспрессионную кассету гена кателицидина, рекомбинировал в плазмиду pBHG (рис. 3).

Каждые 48 ч клетки пересевали, и через 7 дней с момента трансфекции был заметен цитопатический эффект. Из трансфицированных клеток выделена ДНК с помощью Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Cat. A1120, Promega) и проведен ее ПЦР-анализ (рис. 4).

Наличие ампликонов на гексон и ген кателицидина указывает на то, что полученный вирус — аденовирус, содержащий геном кателицидина. Отсутствие ампликонов в области E1 свидетельствует о репликативной дефектности полученного вируса.

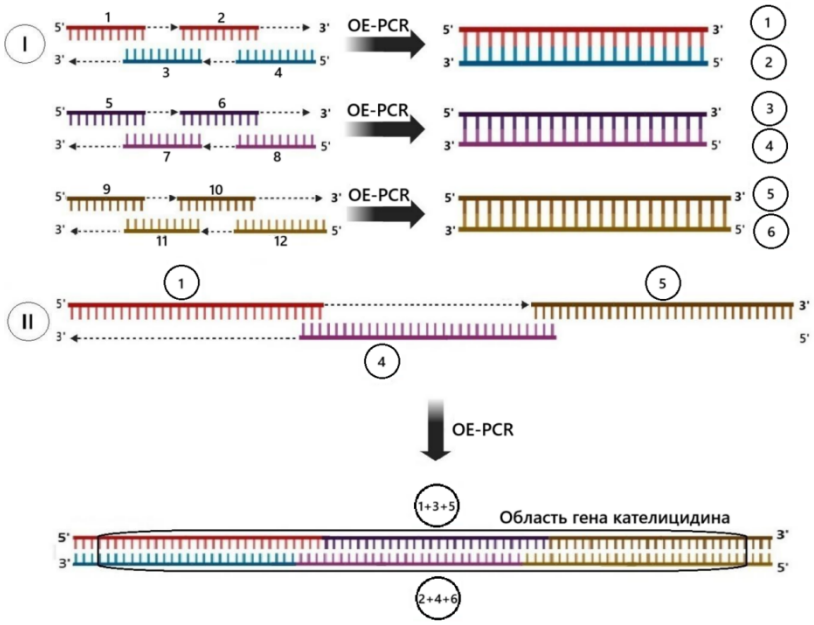


Рис. 1. Схема сборки последовательности, содержащей ген кателицидина: *1–12* — олигонуклеотиды; *I* — *сборка трех частей гена; II* — OE-PCR промежуточных продуктов с образованием последовательности 581 п. о., содержащей ген интереса

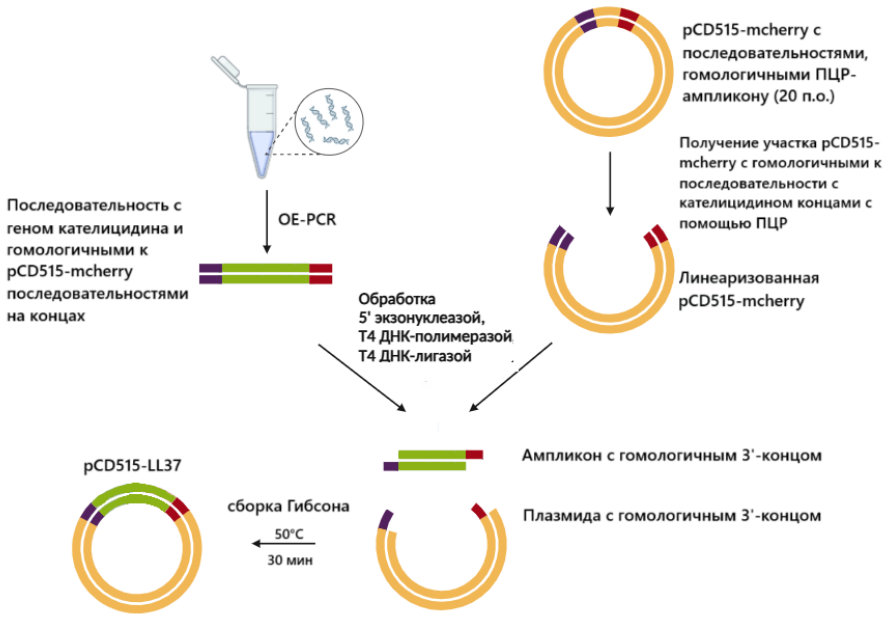


Рис. 2. Схема включения последовательности с геном интереса в шаттл-вектор pCD515-mcherry

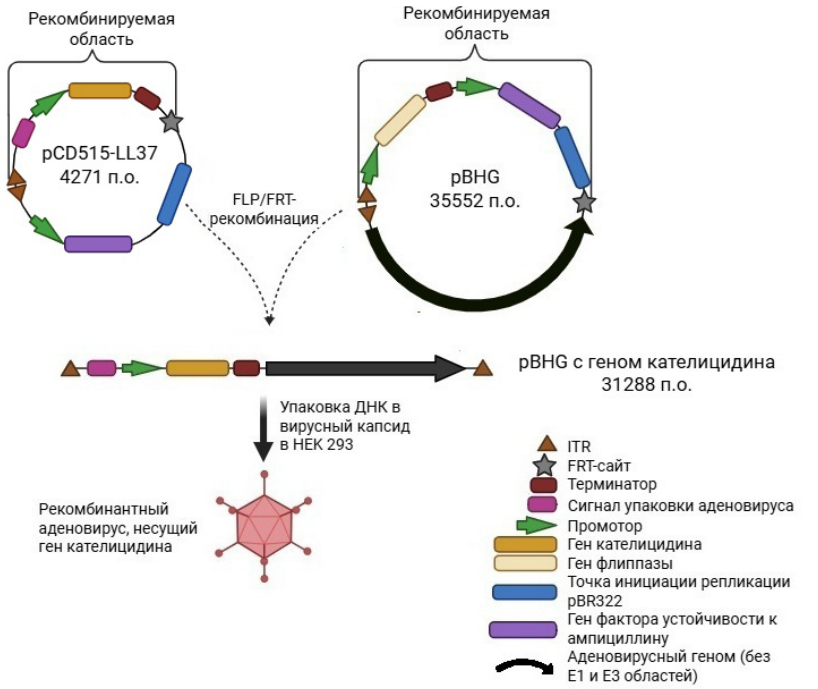


Рис. 3. Схема FLP-FRT-рекомбинации в HEK-293 между pCD515-LL37 и pBHG

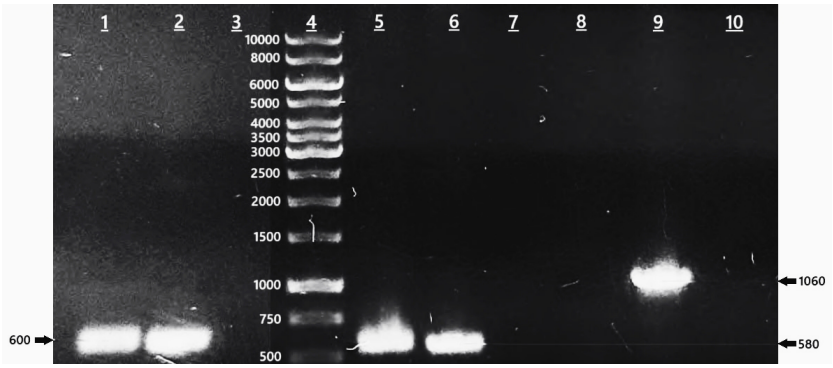


Рис. 4. Визуализация результатов ПЦР анализа в 0,8%-м агарозном геле. *Лунки 1–3:* ПЦР анализ на присутствие гена кателицидина (600 п. о.). *1* — трансфицированные клетки, *2* — положительный контроль, *3* — отрицательный контроль (ПЦР-смесь без добавления ДНК); *4* — GeneRuler 1kb DNA Ladder. *Лунки 5–7*: ПЦР-анализ на присутствие аденовирусного гексона (580 п. о.), *5* — инфицированные клетки, *6* — положительный контроль (pFG140), *7* — отрицательный контроль. *Лунки 8–10:* ПЦР-анализ на присутствие E1-региона (1034 п. о.). *8* — инфицированные клетки, *9* — положительный контроль (pFG140), *10* — отрицательный контроль

Выводы

В ходе работы осуществлен синтез гена человеческого кателицидина методом сборки из праймеров. Полученный ген вставлен в плазмидный шаттл-вектор. Затем получен репликативно-дефектный вектор на основе аденовируса человека 5-го серотипа, несущий ген кателицидина.

Литература

1. World Health Organization WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. URL: https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461 (accessed: 14.05.2025).

2. Wang G. et al. Design of antimicrobial peptides: progress made with human cathelicidin LL-37 // Antimicrob. Peptides: Basics Clin. Appl. 2019. P. 215–240.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-284

АНТИТЕЛА-АБЗИМЫ КРОВИ МЫШЕЙ, СКЛОННЫХ К ИНДУЦИРОВАННОМУ РАЗВИТИЮ АУТОИММУННОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

ANTIBODIES-ABZYMES IN THE BLOOD OF MICE PRONE TO INDUCED DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS

А. Е. Урусов, Г. А. Невинский

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

A. E. Urusov, G. A. Nevinsky

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ urusow.andrew@yandex.ru

Аннотация

Известно, что при развитии аутоиммунных заболеваний в результате изменения профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга происходит образование антител, проявляющих разнообразные каталитические активности, — абзимов. Появление абзимов может достоверно свидетельствовать о начале аутоиммунного заболеваний, а повышение их активности связано с развитием патологии и является индикатором интенсивности патологического процесса. Важной частью исследований аутоиммунных заболеваний является изучение активности антител в биологических жидкостях на разных этапах развития патологии.

Abstract

It is known that the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice occurs due to changes in the differentiation profile of bone marrow stem cells, which leads to the production of antibody-abzymes with various catalytic activities. It has been shown that antibodies with catalase, amylase, RNase, phosphatase, and proteolytic activities appear in the blood of C57BL/6 mice during the development of spontaneous and induced EAE.

Целью работы было изучение изменений активности антител плазмы крови мышей линии C57BL/6, склонных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ), являющегося моделью рассеянного склероза человека, в процессе спонтанного развития ЭАЭ и после иммунизации мышей с помощью МОГ (миелин-олигодендроцитарного гликопротеина) и комплекса ДНК с пятью гистонами.

С помощью аффинной хроматографии были выделены гомогенные препараты антител из крови мышей линии C57BL/6, не иммунизированных и иммунизированных с помощью МОГ и комплекса ДНК с гистонами. Было показано, что уровень каталазной, амилазной, РНКазной, фосфатазной и протеолитической активностей данных антител существенно увеличивается при спонтанном развитии ЭАЭ, а иммунизация мышей указанными антигенами приводит к еще более сильному возрастанию активностей абзимов.

Особое внимание было уделено анализу относительной активности и субстратной специфичности антител против пяти индивидуальных гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4) и основного белка миелина (ОБМ) в гидролизе этих гистонов и ОБМ. Было показано, что, в отличие от абзимов к другим белкам, такие абзимы обладают полиреактивностью в комплексообразовании и перекрестной каталитической активностью. Антитела против каждого из индивидуальных гистонов эффективно гидролизуют каждый из этих гистонов и ОБМ, и наоборот: антитела против ОБМ расщепляют каждый из гистонов.

С помощью MALDI-спектрометрии были получены данные о специфических сайтах гидролиза пяти гистонов антителами против ОБМ и каждого из гистонов. Было впервые показано, что репертуар и количество сайтов гидролиза каждого из гистонов антителами против гистонов и ОБМ очень сильно зависят от использованного антигена (МОГ или комплекс ДНК-гистоны) и стадии развития ЭАЭ: начало (7–8 дней), острая фаза (18–20 дней) и ремиссия (более 25–30 дней). Иммунизация мышей МОГ и комплексом ДНК с гистонами приводит к появлению в крови антител, гидролизующих гистоны по сайтам, набор и число которых сильно отличается от таковых при спонтанном развитии ЭАЭ.

© А. Е. Урусов, Г. А. Невинский, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-285

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ ПРИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ РЕПОРТЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ В ГЕНОМ КЛЕТОК ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА (CHO)

COMPARATIVE ANALYSIS OF PROMOTER ACTIVITY IN SITE-SPECIFICALLY INTEGRATED REPORTER CONSTRUCTS IN THE GENOME OF CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS

А. Д. Шевченко, Е. Н. Андреева

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

A. D. Shevchenko, E. N. Andreyeva

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

✉ a.shevchenko1@g.nsu.ru

Аннотация

При сайт-специфической интеграции целевой конструкции в геном необходимо подбирать промотор для достижения оптимального уровня экспрессии трансгена. Для локуса *LEKR1* в геноме клеток CHO-S проведено сравнение активности 7 промоторов методом проточной цитометрии. Промотор цитомегаловируса человека *CMV* оказался наиболее активным, а промоторы человека (*EF1a*) и китайского хомячка (*HSP90, CHEF1a*) — самыми стабильными при долговременном культивировании.

Abstract

A promoter selection is important for optimal level of transgene expression in site-specifically integrated reporter constructs in the genome. Using flow cytometry, we compared activity of 7 promoters in the LEKR1 locus of the CHO-S cell genome. The human cytomegalovirus promoter *CMV* was found to be the most active, while the human (*EF1a*) and chinese hamster (*HSP90, CHEF1a*) promoters were the most stable during long-term cultivation.

Интеграция трансгена в геном клетки хозяина обеспечивает более стабильные и воспроизводимые титры рекомбинантных белков по сравнению с временной трансфекцией. При случайной интеграции трансгена в геном у эукариот наблюдается «эффект положения», при котором в зависимости от локального хроматинового окружения один и тот же трансген имеет разный уровень экспрессии репортерного гена. В последнее время получили развитие подходы, основанные на направленной интеграции трансгена в геном. Одной из стратегий для быстрого получения клеточных линий-продуцентов на основе клеток CHO является предварительный отбор стартовой клеточной линии с высокой и стабильной экспрессией трансгена, в которой может производиться сайт-специфическая замена кассеты с репортерным трансгеном на другие кассеты, кодирующие целевые рекомбинантные белки. При последующей сайт-специфической интеграции репортерных конструкций в такой сайт ожидается, что эффект положения не будет оказывать влияния на активность используемого промотора. Однако было показано, что и в предварительно охарактеризованных сайтах генома ряд популярных в биотехнологии промоторов может иметь низкий уровень активности [1]. В связи с этим необходим подбор оптимального промотора для каждого локуса.

Ранее участок генома в локусе *LEKR1* клеток CHO-S методом TRIP (*thousands of reporters integrated in parallel*) был идентифицирован как потенциально перспективный для интеграции трансгенов [2]. В настоящей работе при помощи CRISPR/Cas9 была получена стартовая клеточная линия, несущая 1 копию трансгена на клетку для последующей сайт-специфической интеграции в локус *LEKR1*. Целью работы является сравнение активности промоторов вирусов (*SV40E* и *CMV*), человека (*EF1a*) и китайского хомячка (*CHEF1a, PGK1, HSPA5* и *HSP90*) в локусе *LEKR1* генома клеток CHO-S. Нужно отметить, что промоторы *EF1a*, *CHEF1a*, *CMV*, *SV40E* широко используются в биотехнологии и обеспечивают высокие титры продукта, в то время как промоторы *HSPA5, HSP90* были недавно идентифицированы как способные поддерживать стабильные и высокие уровни экспрессии целевых конструкций [3, 4].

Первым этапом работы было сравнение активности выбранных промоторов вне геномного контекста при эписомальной экспрессии. Для этого клетки CHO-S были трансфицированы бивекторными плазмидными конструкциями, содержащими референсный репортер *CMV-mCherry* и целевой репортер *eGFP* под контролем тестируемых промоторов. Методом проточной цитометрии мы показали, что промоторы генов *HSPA5* и *HSP90*

© А. Д. Шевченко, Е. Н. Андреева, 2025

имеют сходный уровень активности с такими сильными промоторами, как *EF1a* или *CHEF1a*, и в 3–4 раза превышают активность слабых промоторов *PGK1* и *SV40E* при эписомальной экспрессии.

Далее активность выбранных промоторов была нами оценена в геномном контексте, а именно при сайт-специфической интеграции конструкций с репортером *mCherry* при помощи сериновой рекомбиназы Bxb1 (*Recombinase Mediated Cassette Exchange* (RMCE)) в геном клеток CHO-S. Уровни экспрессии репортерных конструкций оценивали при помощи проточной цитометрии. Было обнаружено, что в локусе *LEKR1* активность промотора *CMV* оказалась в 6–7 раз выше, чем у всех остальных протестированных нами промоторов. Промоторы *EF1a*, *CHEF1a*, *PGK1, HSPA5* и *HSP90* демонстрировали в геномном контексте сниженную активность по сравнению с эписомальной экспрессией относительно слабого промотора *PGK1*, что говорит о супрессирующем влиянии локального хроматина на экспрессию репортера *mCherry* под контролем этих промоторов в локусе *LEKR1*. Кроме того, оказалось, что при долговременном культивировании промоторы *HSP90*, *EF1a*, *CHEF1a* сохраняют не менее 90 % активности и являются наиболее стабильными в локусе *LEKR1*, в то время как промотор *CMV* снижал уровень активности до 60 % от исходной.

Литература

1. Pristovsek N. et al. Systematic evaluation of site-specific recombinant gene expression for programmable mammalian cell engineering // ACS Synthetic Biol. 2019. Vol. 8, No. 4. P. 758–774.

2. Яринич Л. А. и др. Анализ транскрипционной активности модельных piggyBac-трансгенов, стабильно интегрированных в разные локусы генома культивируемых клеток CHO при отсутствии селекционного давления // Вавилов. журн. генетики и селекции. 2023. Т. 27, № 7. С. 906–915.

3. Tanemura H. et al. Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells // Sci. Rep. 2022. Vol. 12, No. 1. P. 7239.

4. Nguyen L. N. et al. Novel promoters derived from Chinese hamster ovary cells via in silico and in vitro analysis // Biotechnol. J. 2019. Vol. 14, No. 11. P. 1900125.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-286

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И СЕЗОНА НА ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ПРОФИЛИ РАСТЕНИЯ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) *

EFFECT OF GENOTYPE AND SEASON ON THE TRANSCRIPTOME PROFILES OF TEA PLANT (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE)

Р. М. Шхалахова, Л. С. Самарина, Л. С. Малюкова

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр РАН», Сочи

R. M. Shkhalakhova, L. S. Samarina, L. S. Malyukova

Federal Research Centre "The Subtropical Scientific Centre RAS", Sochi

✉ shhalahova1995@mail.ru

Аннотация

Был проведен анализ сезонной динамики транскриптомных профилей трех генотипов чая разной плоидности. Результаты исследования вносят вклад в понимание особенностей транскрипционных механизмов адаптаций к сезонным изменениям у чайного растения. Выявленные дифференциально экспрессирующиеся гены и их функциональное значение подчеркивают сложные молекулярные механизмы, которые управляют качеством чая в изменяющихся условиях.

Abstract

This study, the seasonal dynamics of transcriptomic profiles was analyzed in three tea genotypes of different ploidy levels. The results contribute to understanding the transcriptional adaptation mechanisms to seasonal changes in tea plants. The identified DEGs and their functional significance highlight the complex molecular mechanisms regulating tea quality under changing environmental conditions.

На рост и развитие чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) и качество чая существенно влияют различные факторы, включая особенности генотипа и сезонные изменения (колебания температуры, количества осадков и солнечного света и т. д.) [1]. При этом генотипы чая разной плоидности могут иметь различные транскрипционные и метаболические адаптационные реакции на сезонные изменения. Кроме того, известно, что полиплоидизация может привести к значительным изменениям в морфологии и физиологии растений, увеличивая скорость роста и генетические преимущества по мере увеличения числа хромосом. В связи с этим целью данного исследования было проанализировать общие и отличительные особенности транскриптомных профилей у ди-, три- и тетраплоидных генотипов чая в сезонной динамике.

В качестве материалов были использованы растения из полевой коллекции Федерального исследовательского центра «Субтропический научный центр РАН» (Сочи). Исследовались 3 генотипа: сорт Колхида (диплоид) — контроль, мутантные формы № 582 (триплоид) и № 619 (тетраплоид), выведенные в СССР в 1970–1980-х гг. путем γ-облучения семян сорта Колхида. Для выделения РНК собирали 2-й зрелый лист сверху и сразу помещали в жидкий азот для транспортировки и дальнейшего анализа. Секвенирование мРНК, сборку транскриптомов и аннотацию генов проводили согласно методике ранее опубликованного исследования [2]. Статистический анализ данных проводился с использованием ПО XLSTAT (бесплатная пробная версия) (https://www.xlstat.com/).

Общие механизмы сезонной адаптации у всех генотипов. По данным анализа GO и KEGG, у всех генотипов в июле и августе по сравнению с маем наблюдалось обогащение фенилпропаноидного пути и метаболических путей, связанных защитными стрессовыми реакциями. Ключевые ДЭГи в августе по сравнению с маем у всех генотипов: факторы транскрипции (MYB, WRKY 40, bZip B-box и др.) и киназы (с повышенной экспрессией — leaf rust 10 disease-resistance locus receptor-like protein kinase и Receptor-like protein kinase, а также с повышенной экспрессией — cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 isoform X1), что свидетельствует о важности АБК-зависимых путей передачи сигнала в сезонной регуляции, а также об общей базовой стратегии защиты от биотических и абиотических стрессовых факторов для всех исследуемых генотипов чая.

Общие пути и ДЭГи для генотипов с увеличенной плоидностью. Для генотипов № 582 и 619 в ответ на сезонные изменения отмечено насыщение путей передачи сигнала. Выявлены 68 общих ДЭГов с высокой степенью согласованности ($R^2_{582–619}$ = 0,97 (p-value < 10^{-5})) между генотипами. Среди них — повышенная регуляция аденилосукцинатсинтетазы и гермин-подобных белков, что указывает на повышенную метаболическую активность,

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-16-00058).

© Р. М. Шхалахова, Л. С. Самарина, Л. С. Малюкова, 2025

связанную с синтезом нуклеотидов и реакцией на стресс соответственно. Также наблюдалось повышение регуляции многочисленных генов, кодирующих ферменты синтеза флавоноидов, что потенциально приводит к улучшению качества чая.

Генотип-специфичные ответы на сезонные изменения. У генотипа № 619 были представлены ДЭГи, значительно обогащенные в терминах InterPro: the leucine-rich repeat domain superfamily (IPR032675) и apoptotic protease-activating factors, helical domain (IPR042197). Эти гены в основном участвуют во врожденном иммунитете растений и устойчивости к болезням, что может указывать на повышенную устойчивость к болезням у тетраплоидного генотипа № 619. Меньшее количество ДЭГов у № 619 может указывать на стабильность метаболических процессов в изменяющихся условиях среды. Напротив, более сильное обогащение сигнальных путей у триплоида № 582 и сорта Колхида предполагает потенциально повышенную способность воспринимать и реагировать на сигналы окружающей среды, что может привести к более динамичной и адаптивной стратегии роста [3]. У триплоида № 582 наблюдалось в два раза больше генотип-специфичных ДЭГов по сравнению с тетраплоидом № 619. Среди них треть генов показали белок-белковые взаимодействия. Генная сеть включала гены вторичных метаболитов (KEGG map01110), метаболизма пуринов, системы изоферментов P450 (Reactome Pathways MAP-211897) и гены ядерного протеин-содержащего комплекса (Gene Ontology, GO:0140513), что указывает на сложный, многогранный ответ на сезонные изменения у триплоида. Таким образом, генотипы № 582 и 619 по сравнению с сортом Колхида могут обладать улучшенными регуляторными механизмами, которые позволяют тонко настраивать ответ на сезонные изменения, в конечном итоге влияя на их биохимические профили и, следовательно, на качество чая.

Литература

1. Thakur S., Kumar P., Gupta N. Exploring Regional Influences on Bioactive Components in Tea Leaves and Their Effect on Sensory Quality // J. Food Compos. Anal. 2025. Vol. 144. P. 107683.

2. Kuzmina D., Samarina L., Malyukova L. et al. In vitro VS in vivo transcriptional approach provides new insight on temporal cold response which works without root system in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // Plant Physiol. Biochem. 2025. Vol. 225. P. 109934.

3. Casal J. J., Fankhauser C., Coupland G. et al. Signalling for Developmental Plasticity // Trends Plant Sci. 2004. Vol. 9 (6). P. 309–314.

РАЗДЕЛ VI

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-288

NUTRITIONAL STATUS OF END-STAGE ACHALASIA PATIENTS

Y. M. Al-Alwani[1], I. A. Tarasova[1,2]

[1] *I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*
[2] *Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow*

✉ al-alvani_y@student.sechenov.ru

Abstract

End-stage (or "sigmoid") achalasia is a rare but severe progression of "classic achalasia" characterized by impaired relaxation of the esophagi gastric junction and absent peristalsis. It occurs in fewer than 5 % of patients. Dysphagia in end-stage achalasia of cardia often leads to progressive weight loss. This study comprehensively evaluates assessing the nutritional status of patients with proven end-stage achalasia and compare it with patients in earlier stages.

End-stage achalasia of cardia (ESA) is observed in fewer than 5 % of patients [1]. The esophagus is typically dilated to a diameter greater than 6 cm, becomes tortuous and takes on a sigmoid (S-shaped) appearance. Manometry shows an absence of coordinated esophageal peristalsis and impaired lower esophageal sphincter relaxation [2]. Patients often have longstanding symptoms with marked deterioration severe dysphagia, regurgitation of undigested food, and sometimes aspiration risks. Studies have shown that before definitive treatment, up to 45 % of patients are moderately or severely malnourished Significant unintentional weight loss is common, sometimes over 10–20 % of body weight [3–5]. Despite this obese patients with achalasia are becoming increasingly more common and is estimated to comprise 0.5–1.0 % of the achalasia population [6].

This study aims at comprehensively assessing the nutritional status of patients with proven end-stage achalasia and compare it with patients in earlier stages.

Materials and methods

Between January 2010 and December 2024, nutritional status parameters were studied in 38 consecutive patients undergoing an esophagectomy for end-stage achalasia of cardia. The control group comprised 26 patients with grade 1–3rd achalasia patients (nonESA). The nutritional status was assumed with BMI (kg/m^2), NRS-2002 scale, total protein, albumin, creatinine, glucose, hemoglobin, and lymphocytes levels. Additionally, we compare groups in term of WHO weight status categories associated with BMI ranges for adults: "underweight" (BMI < 18.5 kg/m^2), "normal weight" (BMI 18.5–24.9 kg/m^2), "overweight" (BMI 25–29.9 kg/m^2), and "obesity"(BMI > 30 kg/m^2). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

No significant intergroup differences existed in age at diagnosis or gender distribution. The mean age was 55.5 years (IQR: 40.75–63.00), with female predominance in both groups (ESA: 68.4 %; non-ESA: 65.4 %). Statistically significant difference was detected in years of disease, 11.50 [3.00; 16.00] years in nonESA and 19.00 [14.00; 22.00] years in ESA group, $p < 0.001$. Several patients with ESA had symptoms of disease > 35 years in some ESA cases Statistically significant differences were revealed when comparing of aspiration depending on Group ($p = 0.014$), odds of Yes were 3.632 times greater in ESA group comparing with nonESA (95 % CI: 1.271–10.378). There were no underweight patients is ESA group, and only one patient in nonESA group, but near half of patients in ESA group were overweight (see figure, *a*). The nutritional risk calculated by NRS-2002 was higher in Group ESA, but without statis-

© Y. M. Al-Alwani, I. A. Tarasova, 2025

концентрации 0,1 % и регенерированного кератина. Полный гидролиз кератина прошел за 4 недели, и активность кератиназы составила 120 ± 8 Е/мл.

Литература

1. Nnolim N. E., Udenigwe C. C., Okoh A. I., Nwodo U. U. Microbial keratinase: next generation green catalyst and prospective applications // Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. URL: 10.3389/fmicb.2020.580164 (accessed: 23.07.2025).

2. Moktip T., Salaipeth L., Cope A. E. et al. Current Understanding of Feather Keratin and Keratinase and Their Applications in Biotechnology // Biochem. Res. Int. Vol. 2025, No 1. URL: 10.1155/bri/6619273 (accessed: 23.07.2025).

РАЗДЕЛ VI

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-288

NUTRITIONAL STATUS OF END-STAGE ACHALASIA PATIENTS

Y. M. Al-Alwani[1], I. A. Tarasova[1,2]

[1] *I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*
[2] *Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow*

✉ al-alvani_y@student.sechenov.ru

Abstract

End-stage (or "sigmoid") achalasia is a rare but severe progression of "classic achalasia" characterized by impaired relaxation of the esophagi gastric junction and absent peristalsis. It occurs in fewer than 5 % of patients. Dysphagia in end-stage achalasia of cardia often leads to progressive weight loss. This study comprehensively evaluates assessing the nutritional status of patients with proven end-stage achalasia and compare it with patients in earlier stages.

End-stage achalasia of cardia (ESA) is observed in fewer than 5 % of patients [1]. The esophagus is typically dilated to a diameter greater than 6 cm, becomes tortuous and takes on a sigmoid (S-shaped) appearance. Manometry shows an absence of coordinated esophageal peristalsis and impaired lower esophageal sphincter relaxation [2]. Patients often have longstanding symptoms with marked deterioration severe dysphagia, regurgitation of undigested food, and sometimes aspiration risks. Studies have shown that before definitive treatment, up to 45 % of patients are moderately or severely malnourished Significant unintentional weight loss is common, sometimes over 10–20 % of body weight [3–5]. Despite this obese patients with achalasia are becoming increasingly more common and is estimated to comprise 0.5–1.0 % of the achalasia population [6].

This study aims at comprehensively assessing the nutritional status of patients with proven end-stage achalasia and compare it with patients in earlier stages.

Materials and methods

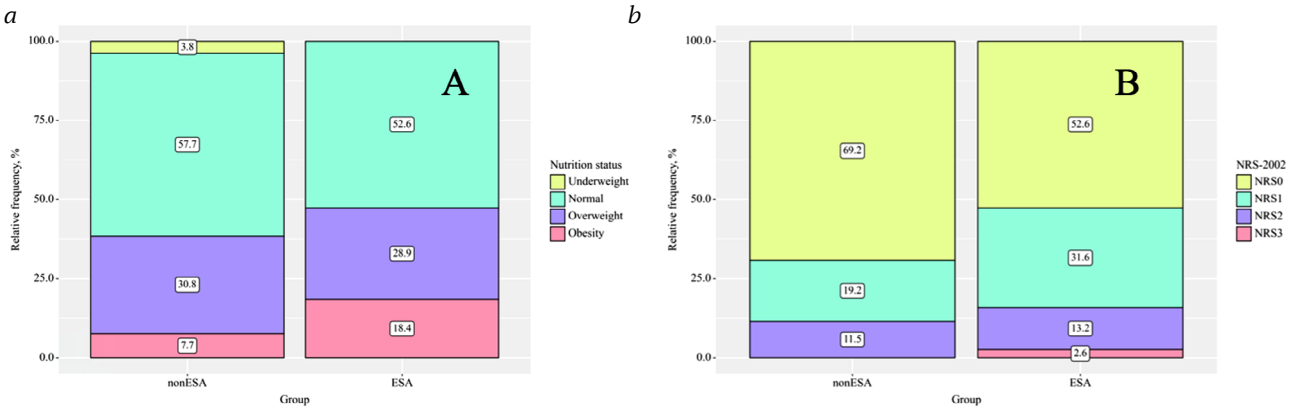
Between January 2010 and December 2024, nutritional status parameters were studied in 38 consecutive patients undergoing an esophagectomy for end-stage achalasia of cardia. The control group comprised 26 patients with grade 1–3rd achalasia patients (nonESA). The nutritional status was assumed with BMI (kg/m^2), NRS-2002 scale, total protein, albumin, creatinine, glucose, hemoglobin, and lymphocytes levels. Additionally, we compare groups in term of WHO weight status categories associated with BMI ranges for adults: "underweight" (BMI < 18.5 kg/m^2), "normal weight" (BMI 18.5–24.9 kg/m^2), "overweight" (BMI 25–29.9 kg/m^2), and "obesity"(BMI > 30 kg/m^2). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

No significant intergroup differences existed in age at diagnosis or gender distribution. The mean age was 55.5 years (IQR: 40.75–63.00), with female predominance in both groups (ESA: 68.4 %; non-ESA: 65.4 %). Statistically significant difference was detected in years of disease, 11.50 [3.00; 16.00] years in nonESA and 19.00 [14.00; 22.00] years in ESA group, $p < 0.001$. Several patients with ESA had symptoms of disease > 35 years in some ESA cases Statistically significant differences were revealed when comparing of aspiration depending on Group ($p = 0.014$), odds of Yes were 3.632 times greater in ESA group comparing with nonESA (95 % CI: 1.271–10.378). There were no underweight patients is ESA group, and only one patient in nonESA group, but near half of patients in ESA group were overweight (see figure, *a*). The nutritional risk calculated by NRS-2002 was higher in Group ESA, but without statis-

© Y. M. Al-Alwani, I. A. Tarasova, 2025

tical difference (see figure, *b*). Despite the BMI was similar, the levels of TP and albumin were higher in ESA group, $p = 0.005$ and $p = 0.006$.



Analysis of weight status (*a*) and NRS-2002 (*b*) conditioning on Group

Conclusion

While mechanical esophageal obstruction in end-stage achalasia (ESA) might be expected to cause weight loss, our study revealed comparable BMI distributions between ESA and non-ESA patients, with a notable proportion of overweight/obese individuals in both groups. However, ESA patients demonstrated significantly higher aspiration risks and postoperative nutritional vulnerability. These findings underscore the importance of preoperative nutritional optimization, tailored dietary interventions as adjunctive therapy and enhanced postoperative monitoring for malnutrition prevention.

References

1. Pesce M., Pagliaro M., Sarnelli G., Sweis R. Modern achalasia: diagnosis, classification, and treatment // Journal of Neurogastroenterology and Motility. 2023. Vol. 29, No. 4. P. 419.

2. Molena D., Yang S. C. Surgical management of end-stage achalasia // Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2012. Vol. 24. P. 19–26.

3. Patel D. A., Vaezi M. F. Achalasia and nutrition: is it simple physics or biology? // Practical Gastroenterology. 2016. Vol. 40, No. 11. P. 42–48.

4. Nabi Z., Basha J., Inavolu P. et al. Comprehensive analysis of nutritional parameters in patients with idiopathic achalasia: a prospective study in India // Indian Journal of Gastroenterology. 2025. Vol. 44, No. 1. P. 57–63.

5. Patel D. A., Lappas B. M., Vaezi M. F. An overview of achalasia and its subtypes // Gastroenterology & Hepatology (NY). 2017. Vol. 13, No. 7. P. 411–421.

6. Almogy G., Anthone G. J., Crookes P. F. Achalasia in the context of morbid obesity: a rare but important association // Obesity Surgery. 2003. Vol. 13, No. 6. P. 896–900.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-289

THE ORAL IRON ABSORPTION TEST IN PATIENTS WITH HIATUS HERNIA

N. Behmard[1], I.A. Tarasova[1,2], A.L. Shestakov[1,2]

[1] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University*
[2] *Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow*

✉ behmardnima3@gmail.com

Abstract
An evaluation of the use of the oral iron absorption test was performed in patients with hiatal hernia before and after surgery.

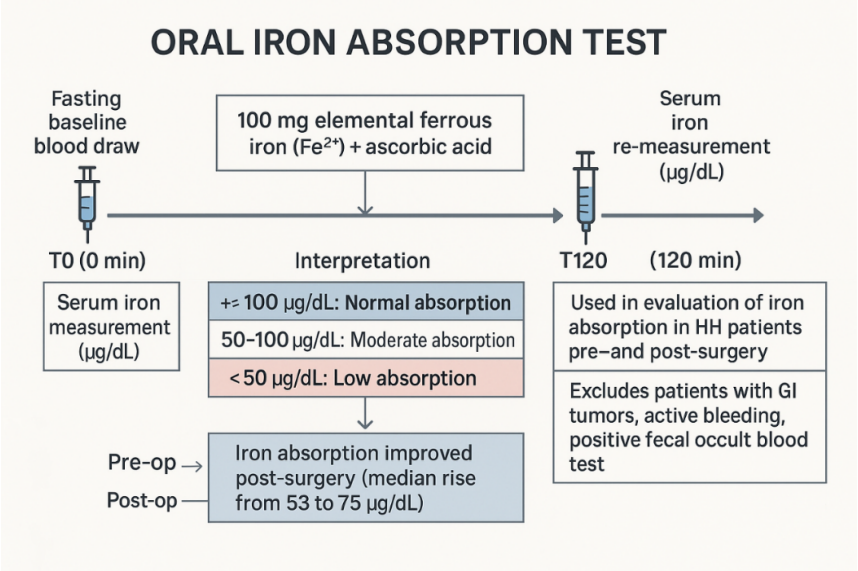
Introduction

Hiatus hernia (HH), mostly paraesophageal, are associated with chronic iron-deficiency anemia. Main hypothesis is chronic blood loss via esophageal and stomach mucus erosions and diapedesis bleeding which are resulted in iron deficiency anemia. Also this the patients with HH receive prolonged antisecretory therapy with proton pump inhibitors (PPI) which can influence the iron absorption too [1]. In the study by F. Panzuto et al. (2004) no improvement in the course of anemia was observed after HH repair and PPI therapy for gastroesophageal reflux, compared with the use of PPI alone [2]. Other studies also report a low effect of conservative therapy without surgical correction of hiatal hernia [3, 4].

We hypotheses that patients with HH may have abnormal iron absorption due to HH. An iron absorption test, most referred to as the Oral Iron Absorption Test (OIAT), is used to evaluate how well the body absorbs iron from the gastrointestinal tract. This test is helpful in diagnosing iron deficiency anemia, iron malabsorption, or determining the best treatment approach (oral versus intravenous iron therapy). The aim of our pilot study was to evaluate the iron absorption in patients with HH with OIAT (see figure).

Materials and methods

A pilot study included 20 patients with hiatal hernias who underwent surgical treatment in the Department of Thoracoabdominal Surgery and Oncology: 16 patients with HH type 1, 1 — with type 2, and 3 with type 3. All patients underwent an oral iron absorption test both preoperatively and one month after surgery. Exclusion criteria were gastric and intestinal tumors, a history of gastrointestinal bleeding confirmed by endoscopy, and/or a positive fecal occult blood test. Additionally, female patients were referred for a gynecological consultation to rule out gynecological diseases. Blood samples are obtained before iron administration (baseline) and at intervals after ingesting 100 mg elemental



Graphical abstract. The iron absorption in patients with hiatus hernia with Oral Iron Absorption Test

© N. Behmard, I.A. Tarasova, A.L. Shestakov, 2025

Fe^{2+} in combination with ascorbic acid on an empty stomach, measuring serum iron at around 2 hours (120 minutes) post-dose a serum. Iron increase above 100 µg/dL suggests normal absorption capacity, 50–100 — moderate and less than 50 — low. The primary point was failed (less than 100) or normal iron absorption. Secondary points include hemoglobin level before and after operation, PPI therapy, and HH types. Differences were considered statistically significant when $p < 0,05$.

Results

The mean age of the patients was 53.2 ± 12.47 years. There were 7 men and 13 women. Seventeen patients received PPI therapy before surgery and 12 after, p = 0.894. An erosive process was detected in 8 patients: 5 with esophageal erosions and 3 with gastric erosions. No correlations were found between the performed therapy, type of hernia, presence of erosive lesions, and OIAT results. In 10 patients, low iron absorption (failed OIAT) was noted before surgery; after surgery, iron absorption levels in all patients exceeded 50 µg/dL, with no cases of low absorption observed postoperatively, p = 0.002. The mean preoperative hemoglobin level was 129 ± 13 g/L; the median iron absorption level before surgery was 53 [38.75; 98.5], which increased after surgery to 75 [49.5; 101.75] µg/dL, p = 0.002.

Conclusion

An oral iron absorption test (OIAT) is a straightforward method for assessing iron absorption in patients with hiatal hernia (HH). To our knowledge, this study is among the first to objectively evaluate iron absorption in HH patients using the OIAT. Our results demonstrate that iron absorption is reduced in patients with HH and significantly improves following surgery. Based on these findings, we suggest that surgical treatment should be considered for patients with HH-associated iron deficiency anemia.

References

1. Ali M. D. Proton pump inhibitors' use and risk of iron deficiency anaemia: a systematic review and meta analysis // Current Reviews in Clinical & Experimental Pharmacology. 2023. Vol. 18, No. 2. P. 158–166.

2. Cheverie J. N. et al. Paraesophageal hernia repair: a curative consideration for chronic anaemia? // Surgical Endoscopy. 2020. Vol. 34, No. 5. P. 2243–2247.

3. Iliev I. E., Loidl A. A 61 year old woman with chronic iron deficiency anaemia due to a Cameron lesion and a response to oral application of combined poloxamer 407 with hyaluronic acid and chondroitin sulfate following single treatment with pantoprazole: a case report // American Journal of Case Reports. 2021. Vol. 22. P. e928021.

4. Panzuto F. et al. Large hiatal hernia in patients with iron deficiency anaemia: a prospective study on prevalence and treatment // Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2004. Vol. 19, No. 6. P. 663–670.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-290

MODELING OF THE SPATIOTEMPORAL DISTRIBUTION OF MEDICINES

F. M. Etezova[1], Y. R. Nartsissov[1,2], E. V. Mashkovtseva[1,3]

[1] *Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow*
[2] *Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Siek, Germany*
[3] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

✉ etezova@icmph.org

Abstract

The assessment and prediction of conjugated and toxic metabolite concentrations within biological systems represents a critical component of pharmacokinetic investigations. This task is crucial, as many pharmacological agents can be transformed into toxic metabolites. Our goal was to develop a comprehensive, multicompartmental model that provides accurate quantitative description of metabolite disposition, taking into account the detailed inter-compartmental transfer of substances throughout the physiological system.

The developed model represents a multi-compartmental system consisting of seven interconnected compartments forming a closed system of vessels and organs. In this study, the intestines and liver are considered as discrete compartments, as they are the most critical for describing the process of drug dissolution and metabolism when administered orally. The portal vein and artery, as well as the hepatic vein, are assumed as separate compartments to ensure precise simulation of hepatic hemodynamics.

This model describes how a test substance is distributed throughout the body after oral administration, taking into account the first-pass metabolic effects. Inter-compartmental transport kinetics is determined by hemodynamic processes, diffusion, and convection [1, 2]. We considered paracetamol as a test substance due to its well-characterized hepatotoxic properties.

The developed model is consistent with the known anatomical and physiological parameters and has been validated in terms of hemodynamic characteristics such as blood flow velocity in individual compartments of the model and complete circulatory transit time. It reproduces the pharmacokinetic characteristics of a test substance. The profile of paracetamol concentrations and its metabolites across various dosage regimens demonstrates the possibility of estimating the dose of acetaminophen based circulating metabolite levels over extended time periods, as well as predicting the concentration of toxic metabolites at various doses. However, the model is versatile, as it can account for the consumption and elimination of any substance by the model's compartments, and also allows for the inclusion of any number of enzymes. This enables the description of biochemical processes of any complexity that follow enzymatic kinetics.

References

1. Nartsissov Y. R. The Effect of Flux Dysconnectivity Functions on Concentration Gradients Changes in a Multicomponent Model of Convectional Reaction-Diffusion by the Example of a Neurovascular Unit // Defect and Diffusion Forum. 2021. Vol. 413. P. 19–28.

2. Nartsissov Y. R. Application of a multicomponent model of convectional reaction-diffusion to description of glucose gradients in a neurovascular unit // Frontiers in Physiology. 2022. Vol. 13. P. 843473.

© F. M. Etezova, Y. R. Nartsissov, E. V. Mashkovtseva, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-291

STAGES OF LYSOSOMAL ENTOSIS IN CANCER TISSUE LUNG AND COLORECTAL CANCER

K. A. Gaptulbarova[1,2], E. A. Kravtsova[1,2], D. S. Dolgasheva[1,2],
I. A. Tsydenova[1–3], S. V. Vtorushin[1–3], N. V. Litviakov[1–3]

[1] *Cancer Research Institute "Tomsk National Research Medical Centre RAS"*
[2] *Tomsk State University*
[3] *Siberian State Medical University, Tomsk*

✉ xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Abstract

Entosis is a process in which viable cells are internalized into neighboring cells of the same type, involving adhesion molecules, while forming cell-in-cell (CIC) structures. It is noted that this behavior is typical for some types of tumors. There are no studies in the literature demonstrating the stages of entosis on the clinical material of cancer patients.

Introduction

In 2007, Overholtzer M. et al. published an article that presented a new process of non-apoptotic cell death in human tumors caused by loss of adhesion to the matrix [1]. Entosis is a non-apoptotic type of cell death, where the internal cell itself actively penetrates the host cell. Entosis occurs between homotypic cells with the participation of adhesion molecules, forming cell-in-cell structures (CIC). Chemotherapy is believed to be able to induce entosis between tumor cells. We assume that under the influence of chemotherapy, due to the entosis mechanism, a fusion of the genetic material of the internalized and engulfing cells can occur, which provokes the occurrence of aneuploidy, in particular, the amplification of stem cell genes [2].

Also in 2017, Garanina A. S. et al. identified 5 stages of lysosomal entosis in situ [3]. There are no studies in the literature demonstrating these stages directly on clinical material from cancer patients.

Material and methods

This study included 40 patients with colorectal cancer (CRC) T1-4N0-2M0-1 and 30 patients with lung cancer (LC) T1-3N0-3M0-1 with a morphologically verified diagnosis. The patient study material was fixed, after which paraffin blocks were made for histological sections. Then standard hematoxylin and eosin staining was performed. For the histological determination of entosis, the Mackay criteria were used [4], which are recognized and used by many laboratories.

The frequency of entosis was compared with the main clinical and morphological parameters of patients (stage, tumor size, degree of differentiation, Grade). Statistical data processing was performed using the Statistica 8 software package (StatSoft Inc., USA). After that, one sample from each localization was selected for visualization of entosis on a 3D HISTECH PANNORAMIC MIDI histoscanner. Statistical data processing was performed using the Statistica 8 software package (StatSoft Inc., USA).

Results

For each slide, twenty randomly selected fields of the histological preparation were taken, in which the search and counting of entotic structures was carried out (fig. 1). The average frequency of occurrence in patients with CRC was 0.25, and in patients with LC — 0.07.

Next, we analyzed the relationship between the frequency of entotic events with the main clinical and morphological parameters of patients: tumor size, stage, degree of differentiation, degree of malignancy. As a result of the analysis, it was revealed that the frequency of entotic events practically did not correlate with the clinical and morphological parameters. A relationship was shown between the age of patients and the number of CICs ($p = 0.007$) in CRC, as well as between lymphogenous metastasis and the number of CICs ($p = 0.03$) in LC.

The prognostic significance of CIC structures was also assessed (fig. 2). The overall survival of colorectal cancer patients and metastasis-free survival of lung cancer patients were calculated. In patients with LC who did not have entoses, metastasis-free survival was almost 80 %, in patients with entoses this indicator was 2 times lower ($p = 0.05$).

To visualise the results, we selected one sample for each localisation with a CIC frequency of more than 0.3 in the clinical material. In the process, we were able to identify 5 consecutive stages of lysosomal entosis.

© K. A. Gaptulbarova, E. A. Kravtsova, D. S. Dolgasheva, I. A.Tsydenova, S. V. Vtorushin, N. V. Litviakov, 2025

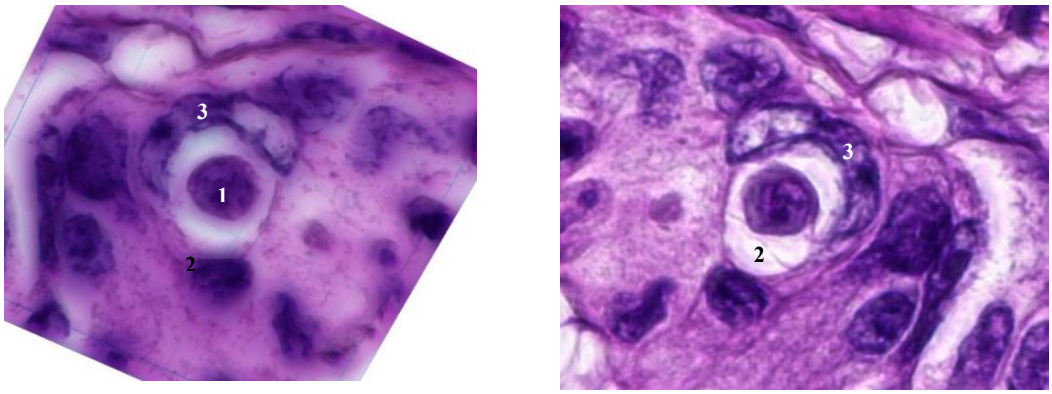


Fig. 1. Entosis images obtained with 3D HISTECH PANNORAMIC MIDI:
1 — the nucleus of the inner cell; *2* — entotic vacuole; *3* — the nucleus of the host cell

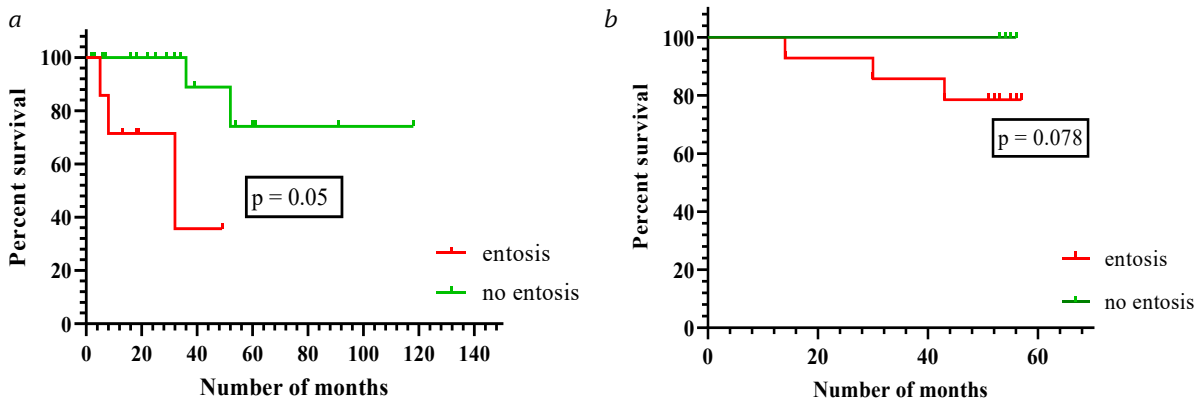


Fig. 2. Graph of metastatic-free survival of lung cancer patients (*a*)
and graph of overall survival of colorectal cancer patients (*b*)

Conclusion

In connection with the results obtained, the study of entosis will be continued; it may provide a key to understanding the mechanism of rapid development of aneuploid subpopulations of tumour cells during chemotherapy and tumour progression. We have also managed to confirm the existence of the stages of entosis in cell cultures, which have been identified in the literature.

References

1. Overholtzer M., Mailleux A. A., Mouneimne G. et al. A non-apoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion // Cell. 2007. Vol. 131, No. 5. P. 966–979.

2. Gaptulbarova K. A., Tsydenova I. A., Dolgasheva D. S. et al. Mechanisms and significance of entosis for tumour growth and progression // Cell Death Discovery. 2024. Vol. 10, No. 1. P. 109.

3. Garanina A. S., Kisurina-Evgenieva O. P., Erokhina M. V. et al. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, No. 1. P. 12555.

4. Mackay H. L., Moore D., Hall C. et al. Genomic instability in mutant p53 cancer cells upon entotic engulfment // Nature Communications. 2018. Vol. 9, No. 1. P. 1–15.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-292

VACUUM ASPIRATION AND NPWT IN CHEST WOUND INFECTIONS AND PLEURAL EMPYEMA

H. Hosseini[1], I.A. Tarasova[1,2]

[1] *I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*
[2] *Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow*

✉ amirhosseini148@yahoo.com

Abstract

Negative pressure wound therapy (NPWT) and vacuum aspiration significantly improve outcomes in chest wound infections and pleural empyema. NPWT promotes rapid wound healing, reduced mortality, and shorter hospital stays compared to traditional methods.

Chest wound infections and empyema present serious therapeutic challenges. NPWT, involving sealed vacuum dressings, actively removes exudate, promotes perfusion, and accelerates healing. Clinical evidence demonstrates NPWT significantly reduces mortality (~ 54 %), reinfection (~ 57 %), hospital stay (4.5 days), and ICU duration (1.1 days) in deep sternal wound infections compared to traditional care [1, 2]. Similarly, thoracic wound infections treated with NPWT experience faster wound closure, reduced complications, and shorter hospitalization [3–6]. In chronic empyema cases, NPWT dramatically reduces cavity closure time, facilitating earlier definitive surgical intervention. Safety considerations include protection of vital structures and management of potential complications such as bleeding or air leaks [7, 8]. Overall, NPWT has become an essential part of managing complex thoracic infections, significantly improving patient recovery and clinical outcomes.

Materials and methods

This study reviewed clinical data on negative pressure wound therapy (NPWT) and vacuum aspiration in chest wound infections and pleural empyema. NPWT involved sealed dressings connected to a vacuum pump for continuous exudate removal, perfusion improvement, and granulation tissue stimulation. Literature data were analyzed for mortality, reinfection, hospital stay, ICU stay, wound closure time, and complication rates compared with traditional care.

Results

NPWT significantly reduced mortality (~ 54 %) and reinfection (~ 57 %) rates in deep sternal wound infections compared with conventional therapy. Average hospital stay decreased by approximately 4.5 days, and ICU stay by 1.1 days. Patients with thoracic wound infections achieved faster wound closure and fewer complications. In chronic empyema, NPWT shortened cavity closure time, enabling earlier definitive surgical treatment.

Conclusion

NPWT and vacuum aspiration represent effective adjunctive treatments for complex thoracic infections and pleural empyema. They promote rapid wound healing, reduce complications, and shorten hospitalization. Clinical protocols should incorporate NPWT in suitable cases, with careful attention to safety measures such as protecting vital structures and managing risks like bleeding or air leaks.

References

1. Palmen M., van Breugel N. A., Geskes G. G. et al. Open window thoracostomy treatment of empyema is accelerated by vacuum-assisted closure // The Annals of Thoracic Surgery. 2009. Vol. 88, No. 4. P. 1131–1136.

2. Obdeijn M. C., de Lange M. Y., Lichtendahl D. H., de Boer W. J. Vacuum-assisted closure in the treatment of poststernotomy mediastinitis // The Annals of Thoracic Surgery. 1999. Vol. 68, No. 6. P. 2358–2360.

3. Liu Y.-T., Hsu C.-C., Chen S.-H. et al. Effectiveness and safety of negative pressure wound therapy in patients with deep sternal wound infection: a systematic review and meta-analysis // International Journal of Surgery. 2024. Vol. 110, No. 12. P. 8107–8125.

4. Haghshenasskashani A., Rahnavardi M., Yan T. D., McCaughan B. C. Intrathoracic application of vacuum-assisted closure (VAC) in managing pleural space infection after lung resection: is it an option? // Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. 2011. Vol. 13, No. 2. P. 168–174.

5. Elhassan H., Amjad R., Palaniappan U. et al. Negative pressure wound therapy for prevention of sternal wound infection: a systematic review and meta-analysis // Journal of Cardiothoracic Surgery. 2024. Vol. 19, No. 1. P. 87.

© H. Hosseini, I.A. Tarasova, 2025

6. Miller C., Tolentino E. The history of negative pressure wound therapy: from “lip service” to modern NPWT // Wounds. 2014. Vol. 26, No. 10. P. S2–S6.

7. Thomas M., Makey I., Buchanan M. A. et al. A comparison of negative pressure and conventional therapy in infected open chest wounds // Surgical Infections. 2021. Vol. 22, No. 9. P. 955–961.

8. Shen K. R., Bribriesco A., Crabtree T. et al. The American Association for Thoracic Surgery consensus guidelines for the management of empyema // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2017. Vol. 153, No. 6. P. e129–e146.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-293

ATOMIC LAYER DEPOSITION OF NOVEL NANOMATERIALS BASED ON METAL-DOPED TITANIUM DIOXIDE TO COMBAT ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA*

A. M. Maksumova, I. M. Abdulagatov, S. G. Gadzhimuradov, M. N. Gafurova

Dagestan State University, Makhachkala

✉ abay.maksumova2016@yandex.ru

Abstract

The new nanomaterials developed based on TiO_2 doped with vanadium, chromium and molybdenum atoms using atomic layer deposition technology have high antibacterial activity against pathogenic bacteria and are biocompatible during implementation into the body of animals. The developed nanotechnology will contribute to the treatment of bacterial infectious diseases, including those caused by antibiotic-resistant bacteria.

The problem of antibiotic resistance of bacteria is recognized by the World Health Organization as one of the ten global threats to humanity. The development of new antibacterial drugs is proposed as a solution to this problem, but the process of developing new antibiotics is complex and expensive, while bacteria quickly adapt to new drugs. Due to their universal mechanisms of antibacterial action, including the destruction of the cell membrane, stopping the division of bacterial cells and their destruction by oxidation of the cellular substance, nanomaterials with antibacterial properties are used to prevent bacterial infections caused by pathogenic microorganisms resistant to antimicrobial drugs. Among the widely used materials, TiO_2 is known due to its non-toxicity, chemical inertness and antibacterial properties. The mechanism of antibacterial action of TiO_2 is relatively well studied and is explained by its photocatalytic (PC) properties. Due to the PC properties, active oxygen species (ROS) are generated on the TiO_2 surface, causing oxidation of internal enzymes and lipid peroxidation of bacterial cells, which reduces respiratory activity and leads to their death. Doping with transition metals is a promising approach to reducing the absorption threshold of TiO_2 and shifting its optical absorption range from the UV light region to the visible part of the spectrum.

We have proposed new reaction systems for the synthesis of titanium dioxide nanofilms doped with vanadium, chromium and molybdenum atoms using atomic layer deposition (ALD) technology. Precursors such as titanium tetrachloride ($TiCl_4$), vanadium oxytrichloride ($VOCl_3$), chromium dichloride dioxide (CrO_2Cl_2), molybdenum oxytetrachloride ($MoOCl_4$), molybdenum dichloride dioxide (MoO_2Cl_2) and water are used to synthesize these nanofilms. The temperature of nanofilm synthesis varies from room temperature to 180 °C, which makes it possible to apply nanocoatings to substrates of various origins (polymer, metal, glass, etc.). To achieve antibacterial properties, a nanocoating thickness of approximately 5 nm is sufficient, which makes the technology cost-effective, scalable and easily commercialized. The use of the ALD method allows obtaining homogeneous highly conformal nanocoatings on the surface of products and substrates of various shapes and sizes with high adhesion, which prevents the release of nanocoating components (metal atoms) into the environment and allows for their long-term multiple use.

Serious complications associated with bacterial infections most often accompany surgeries to introduce implants into the body. Bacterial infection occurs as a result of the adhesion of bacteria and their colonization on the surface of implants and leads to the formation of a biofilm. Bacteria are not free-floating cells, but specifically organized biofilms attached to the substrate, so it is difficult to destroy this biofilm chemically, biologically or mechanically. In our works [1, 2] we demonstrated the efficiency of using ALD nanocoatings based on titanium dioxide doped with vanadium when introducing polypropylene hernia mesh implants and non-absorbable surgical suture materials into the body of rats and rabbits. ALD nanocoating made it possible to increase the biocompatibility and antibacterial properties of the implanted materials, which helps to reduce the inflammatory reaction of the tissues surrounding the implant and helps prevent the eosinophilic cellular response to a foreign body. Microbiological studies conducted using the Koch method showed high antibacterial efficiency of ALD nanocoatings based on titanium dioxide doped with vanadium, molybdenum and chromium in relation to microorganisms of the E.Coli and S.Aureus strains.

Thus, large-scale implementation of the achievements of modern nanotechnology and new synthesized antibacterial nanomaterials using atomic layer deposition (ALD) technology will allow progress in the field of nanomedical technologies in the treatment of bacterial infectious diseases.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #25-23-20161).

© A. M. Maksumova, I. M. Abdulagatov, S. G. Gadzhimuradov, M. N. Gafurova, 2025

References

1. Abdulagatov I. M., Khanaliev V. Y., Ragimov R. M. et al. Atomic-layer-deposition application for antibacterial coating of biomedical materials: surgical sutures // Biomedical Materials. 2025. Vol. 20. ID 025012.

2. Abdulagatov I. M., Ragimov R. M., Khamidov M. A. et al. ALD coated polypropylene hernia meshes for prevention of mesh-related post-surgery complications: An experimental study in animals // Biomedical Materials. 2022. Vol. 17. ID 015006.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-294

COMBINED AND INDIVIDUAL IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF COLORECTAL CANCER-DERIVED GALECTIN-1 AND -3 ON CD4⁺ T CELL FUNCTION *

V. S. Poletika[1], G. V. Reingardt[2], A. V. Kurnosenko[1,2], Yu. V. Kolobovnikova[1], O. I. Urazova[1]

[1] *Siberian State Medical University, Tomsk*
[2] *Tomsk Regional Oncology Center*

✉ vpoletika@yandex.ru

Abstract

This study investigates how colorectal cancer (CRC) cells modulate CD4⁺ T cell function via galectin-1 and -3 in transwell co-cultures with patient or healthy donor immune cells. Gal-1 consistently suppresses Th1/Th17 and promotes Treg activity, while Gal-3 exhibits context-dependent effects. Combined Gal-1/Gal-3 action additively enhances Treg function but redundantly suppresses Th1/Th17 in CRC.

Immune evasion by tumor cells is critical for colorectal cancer (CRC) progression. Galectin-1 (Gal-1) and galectin-3 (Gal-3), β-galactoside-binding lectins overexpressed in CRC, are potent immunomodulators that suppress anti-tumor T cell responses [1]. While their individual roles are established in various malignancies, the combined impact of CRC-derived Gal-1 and Gal-3 on key CD4⁺ T-helper subsets (Th1, Th17) and regulatory T cells (Treg) — particularly in diseased versus healthy immune contexts — remains poorly characterized. Furthermore, galectin functions exhibit significant plasticity across tumor types and immune cell states, hindering translational applications and targeted therapy development [2]. This study aimed to dissect the individual and combined effects of CRC-derived Gal-1 and Gal-3 on T cell function in an *in vitro* transwell co-culture model with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from CRC patients or healthy donors.

The human CRC cell line COLO 201, expressing both Gal-1 and Gal-3, was co-cultured with PBMCs from treatment-naïve CRC patients or age-matched healthy donors using transwell systems (0.4 μm pore membrane), enabling soluble factor exchange without direct cell contact. PBMCs were activated using Phytohemagglutinin-P. Four conditions were tested: 1) intact co-culture (control), 2) co-culture with Gal-1 inhibitor OTX 008, 3) co-culture with Gal-3 inhibitor GB1107, and 4) co-culture with both Gal-1 and Gal-3 inhibitors. After 72 hours, PBMC supernatant levels of lineage-defining cytokines — IFNγ (Th1), IL-17A (Th17), and TGFβ1 (Treg) — were quantified by ELISA. Data was analyzed using non-parametric Friedman test with Dunn's post-hoc.

Selective Gal-1 inhibition in COLO 201-PBMC co-cultures significantly increased IFNγ and IL-17A production while decreasing TGFβ1 secretion by PBMCs from both CRC patients and healthy donors relative to controls. In co-cultures with patient-derived PBMCs, Gal-3 inhibition similarly enhanced IFNγ and IL-17A levels and reduced TGFβ1. However, in healthy donor PBMC co-cultures, Gal-3 blockade induced only a modest IFNγ increase but significantly suppressed IL-17A production and elevated TGFβ1. Combined Gal-1/Gal-3 blockade in patient PBMC co-cultures produced a greater reduction in TGFβ1 than individual inhibition (indicating additive stimulation of TGFβ1 secretion by both galectins), while IFNγ/IL-17A changes mirrored single-inhibitor effects (demonstrating functional redundancy in Th1/Th17 suppression). In healthy donor PBMC co-cultures, combined inhibition showed no synergistic effects beyond Gal-1 blockade alone.

In conclusion, CRC-derived Gal-1 acts as a consistent tolerogenic driver, suppressing IFNγ/IL-17A and promoting TGFβ1 secretion by PBMCs regardless of their source. In contrast, Gal-3 exhibits marked plasticity: it mimics Gal-1's tolerogenic role in the CRC context (patient PBMCs) but exerts pro-inflammatory effect on naïve immunity (healthy PBMCs), stimulating IL-17A while downregulating TGFβ1. The results of combined galectin inhibition indicate that Gal-1/Gal-3 additively drive TGFβ1 secretion but redundantly inhibit Th1/Th17 responses in CRC. These findings underscore the necessity of studying combinatorial galectin effects in disease-relevant contexts and highlight Gal-1 and -3 as compelling co-targets for CRC immunotherapy.

References

1. Thijssen V. L., Heusschen R., Caers J., Griffioen A. W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1855, No. 2. P. 235–247.

2. Kapetanakis N. I., Busson P. Galectins as pivotal components in oncogenesis and immune exclusion in human malignancies // Front. Immunol. 2023. Vol. 14.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #25-25-20109) and a subsidy grant allocated by the Department of Scientific, Technological Development and Innovative Activities of Tomsk Region (agreement #02/3/2025).

© V. S. Poletika, G. V. Reingardt, A. V. Kurnosenko, Yu.V. Kolobovnikova, O. I. Urazova, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-295

BEYOND NETS: DNASE I TREATMENT SHOWS IMMUNOSTIMULATORY EFFECTS AND MODIFIES NEUTROPHIL PHENOTYPE AND FUNCTIONALITY IN TUMOR-BEARING MICE *

K. Sounbuli[1,2], L.A. Alekseeva[1], A.V. Sen'kova[1], O.V. Markov[1], I.A. Savin[1], M.A. Zenkova[1], N.L. Mironova[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ khetam.sounbuli.edu@gmail.com

Abstract

DNase I is a promising anti-tumor agent degrading neutrophil extracellular traps (NETs). However, its effect on the immune system beyond NET degradation is not investigated. In this study, we show that DNase I treatment in mice bearing lymphosarcoma RLS_{40} enhances the anti-tumor neutrophil phenotype, reduces neutrophil capacity to produce NETs, and induces immune activation. These findings suggest a potential role for DNase I in future anti-cancer therapies.

Recently, neutrophils have been identified as important players in the tumor microenvironment (TME). They were shown to acquire antitumor or protumor phenotypes in the TME. Moreover, neutrophils can secrete neutrophil extracellular traps (NETs), which support tumor growth and metastasis. DNase I treatment has been shown to reduce tumor growth and aggressiveness, mainly by degrading tumorigenic cell-free DNA and NETs. In this study, we investigated the effect of DNase I treatment on the neutrophil population and the overall immune response.

A murine model of chemotherapy-resistant lymphosarcoma (RLS_{40}) was established, and mice were administered DNase I (100 U/ mouse) or saline buffer (control) for 5 days per week, with the mice being left untreated for 2 days, over the course of 3 weeks. On day 21, the mice were divided into 2 groups in accordance with tumor node size (RLS_{40}^{High} > 1 cm^3, RLS_{40}^{Low} < 0.1 cm^3). Histological analysis of tumors and thymus were performed, and splenic neutrophils were isolated and characterized using RT-qPCR, flow cytometry and florescent microscopy.

DNase I treatment exhibited immunostimulatory effects, as evidenced by an increased thymus cortex-to-medulla ratio and enhanced macrophage infiltration in the thymus and tumors. In comparison with the RLS_{40}^{High} group, neutrophils from the RLS_{40}^{Low} group exhibited an antitumor profile with higher *Icam*, *Tnfa*, and *Cd274* gene expression. Treatment with DNase I enhanced the observed anti-tumor features with a significant elevation in the expression of the above-mentioned genes and a decrease in the expression of the immunosuppressive genes *Ccl17* and *Il10*. Flow cytometric analysis showed an increase in the percentage of anti-tumor neutrophils in the RLS_{40}^{Low} group after DNase I treatment, with an increase in the PD-L1$^+$, ICAM-1$^+$, FAS$^+$ and IFNɣR1$^+$ populations. The most interesting result was the ability of DNase I to reduce the capacity of neutrophils to produce NETs after chemical activation in vitro with calcium ionophore A23187. Neutrophils isolated from RLS_{40}^{High}-bearing mice were characterized with higher NET formation percentage in comparison to RLS_{40}^{Low} group. Neutrophils isolated from DNase I treatment groups were characterized by reduced ability to secret NETs.

In conclusion, in tumor-bearing mice DNase I treatment shows immunostimulatory effects and modifies neutrophil phenotype and functionality. These findings highlight the potential of DNase I as a future anti-cancer therapy.

* The study is supported by the Russian Science Foundation (project #19-74-30011).

© K. Sounbuli, L.A. Alekseeva, A.V. Sen'kova, O.V. Markov, I.A. Savin, M.A. Zenkova, N.L. Mironova, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-296

STUDY OF THE POSSIBILITIES OF RESTORING THE CONDUCTION OF WAVE EXCITATION IN FIBROUS AREAS OF THE MYOCARDIUM USING REPROGRAMMING OF NON-EXCITABLE CARDIOMYOCYTE CELLS

E.A. Turchaninova[1,2], S.D. Robustova[1], S.G. Kovalenko[1–3], V.D. Dzhabrailov[1,2], A.A. Dolgodvorova[1], S.A. Romanova[1], M.M. Slotvitsky[1–3], K.I. Agladze[1,3], V.A. Tsvelaya[1–3]

[1] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2] *E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk*
[3] *M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute*

✉ turchaninova.ea@phystech.edu

Abstract

Electrical waves are transmitted in cardiac tissue by excitable cells — cardiomyocytes. Excessive fibroblast content can interfere with the propagation of electrical signals. The presented work is devoted to the development of a minimized chemical cocktail that reprograms fibroblasts into functional cardiomyocytes with sufficient efficiency. This work represents a new potential application of regenerative medicine in the field of cardiovascular disease.

The disruption of normal electromechanical excitation wave propagation in cardiac tissue can lead to cardiac arrhythmias, asynchronous myocardial contractions, and even cardiac arrest. Electromechanical excitation waves are transmitted by excitable cardiac cells — cardiomyocytes. Following ischemia or other pathological conditions, these conducting cells may be replaced by non-conductive fibroblasts. Excessive fibroblast content in cardiac tissue interferes with proper excitation wave propagation throughout the myocardium.

The presented work is devoted to the development of a minimized four-component chemical cocktail (CHIR99021, BMP4, Activin A, IWP2) that efficiently reprograms fibroblasts into functional cardiomyocytes without pluripotent stage. Importantly, the minimal component design enhances clinical translatability by simplifying manufacturing and reducing potential immunogenicity compared to complex multi-factor cocktails. This strategy represents a promising path toward clinical application, offering a safe and effective solution for restoring cardiac function post-MI through endogenous tissue reprogramming. The minimized cocktail design provides an optimal balance between functional efficacy and practical therapeutic implementation. Quantitative analyzes in this study included calcium imaging (Fluo-4), patch clamp electrophysiology, immunocytochemistry of the cardiac marker α-actinin, and conduction velocity measurements using an optical mapping and potential-dependent dye (Di-8-ANEPPS).

Our results demonstrate 56–83 % conversion efficiency to α-actinin-positive cells across rat and human fibroblast models, with the derived cells exhibiting characteristic calcium transients. In vivo studies in rat models of myocardial infarction (MI) confirmed systemically delivered cocktail safety, showing no hematological toxicity, while optical mapping revealed 84 % conductive area in treated infarcts (vs. 71 % controls). Crucially, partial reprogramming sufficed to establish conduction pathways exceeding the percolation threshold (20–30 %), enabling electrical propagation. This work represents a new potential application of regenerative medicine in the field of cardiovascular disease.

© E.A. Turchaninova, S.D. Robustova, S.G. Kovalenko, V.D. Dzhabrailov, A.A. Dolgodvorova, S.A. Romanova, M.M. Slotvitsky, K.I. Agladze, V.A. Tsvelaya, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-297

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНТЕРФЕРОНА α-2B И ЭНДОЛИЗИНА GRC-ML07 ПРИ ТЕРАПИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН В УСЛОВИЯХ НАРУШЕННОГО ИММУННОГО СТАТУСА *

WOUND HEALING POTENTIAL OF INTERFERON α-2B AND ENDOLYSIN GRC-ML07 IN THE TREATMENT OF INFECTED WOUNDS UNDER COMPROMISED IMMUNE CONDITIONS

М. М. Абдулкадиева[1,2], Д. А. Слонова[1], Н. П. Антонова[1], К. А. Собянин[1,3], В. В. Литвиненко[2,4], О. В. Паршина[1], Т. С. Гусева[1], П. А. Домнин[1], Д. В. Васина[1], Е. В. Сысолятина[1]

[1] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва*
[2] *Объединенный институт высоких температур РАН, Москва*
[3] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*
[4] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

M. M. Abdulkadieva[1,2], D. A. Slonova[1], N. P. Antonova[1], K. A. Sobyanin[1,3], V. V. Litvinenko[2,4], O. V. Parshina[1], T. S. Guseva[1], P. A. Domnin[1], D. V. Vasina[1], E. V. Sysolyatina[1]

[1] *N. F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow*
[2] *Joint Institute for High Temperatures RAS, Moscow*
[3] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[4] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ Maryam094@yandex.ru

Аннотация

Использование комбинации интерферона α-2b и генно-инженерного эндолизина GRC-ML07 в фазе воспаления приводило к снижению бактериальной нагрузки в ранах и уровня провоспалительных цитокинов, а также способствовало ускорению заживления инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран у мышей с иммунной супрессией.

Abstract

The application of a combination of interferon α-2b and engineered lysin GRC-ML07 during the inflammatory phase resulted in a reduction of bacterial load within the wounds, a decrease in pro-inflammatory cytokine levels, and facilitated the acceleration of healing processes in *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in immunosuppressed mice.

Процесс заживления ран представляет собой сложную последовательность фаз воспаления, пролиферации и ремоделирования тканей, требующую точной регуляции со стороны иммунной системы. В условиях иммунной супрессии, возникающей вследствие применения иммунодепрессивных препаратов, злокачественных заболеваний, вирусных инфекций или трансплантационной терапии, а также как следствие кровопотери и шока после ранения эти процессы существенно нарушаются. Это приводит к удлинению воспалительной фазы, снижению пролиферативной активности клеток, повышению риска бактериальных осложнений и развитию хронических ран. Проблема эффективного заживления ран на фоне иммунной супрессии имеет высокую клиническую значимость, поскольку ассоциируется с увеличением сроков госпитализации, риском септических состояний и летальных исходов. В связи с этим актуальной задачей является разработка новых терапевтических стратегий, направленных на восстановление механизмов регенерации и противоинфекционной защиты в условиях нарушенного иммунного статуса.

Целью данного исследования была оценка эффективности комбинации стимулятора врожденного иммунитета — рекомбинантного интерферона α-2b — с антибактериальным агентом генно-инженерным бактериолитическим ферментом GRC-ML07 при терапии инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран в условиях иммунной супрессии.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 056-00006-24-02.

© М. М. Абдулкадиева, Д. А. Слонова, Н. П. Антонова, К. А. Собянин, В. В. Литвиненко, О. В. Паршина, Т. С. Гусева, П. А. Домнин, Д. В. Васина, Е. В. Сысолятина, 2025

Модель иммуносупрессии создавалась у мышей линии BALB/c (самцы, масса ⩾ 22 г) путем внутрибрюшинного введения циклофосфана в дозе 1200 мкг/мышь. Через три дня на спине животных формировали полнослойные кожные раны диаметром 12 мм с наложением предотвращающих контрактуру колец аналогичного диаметра. После формирования ран в каждую вносили 10^7 КОЕ *Pseudomonas aeruginosa* 21, поверхность ран закрывали медицинским пластырем.

В ходе эксперимента мыши были распределены на группы: 1) контрольная группа — инфицирование ран без последующего лечения; 2) «Интерферон» — через 24 ч после формирования ран в них вносили интерферон α-2b (концентрация 4×10^7 МЕ/мл) по 100 мкл дважды в день в течение 4 суток; 3) «Плацебо» — через 24 ч после формирования ран дважды в день в течение 4 суток в раны вносили по 100 мкл альгинатного геля без активных компонентов; 4) «Эндолизин» — через 24 ч после формирования ран дважды в день в течение 4 суток в раны вносили по 100 мкл эндолизина, разведенного в альгинатном геле; 5) «Интерферон + Эндолизин» — через 24 ч после формирования ран в первой половине дня в рану вносили по 100 мкл интерферона, во второй половине дня — по 100 мкл эндолизина, на протяжении 4 суток.

На 7-е сутки в группах интерферонотерапии и, особенно, комбинированной терапии отмечались признаки активного очищения ран: сухость поверхности, краевое слущивание струпа и отсутствие гнойного экссудата. В контрольной группе наблюдалось скопление гнойных масс под струпом и признаки выраженного воспаления. Количественная оценка бактериальной обсемененности раневой поверхности показала снижение числа жизнеспособных бактерий в среднем на два порядка в группах терапии по сравнению с контролем.

Гистологический анализ продемонстрировал, что применение интерферона вызывало усиление воспалительной реакции в ранний период (4–7-е сутки), что проявлялось выраженной лейкоцитарной инфильтрацией в зоне дефекта. Применение эндолизина, как в монотерапии, так и в сочетании с интерфероном, способствовало ускоренной реэпителизации и ремоделированию тканей по сравнению с контролем.

Иммуноферментный анализ струпов выявил достоверное снижение уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-17А, ИЛ-1β, ФНО-α, ГМ-КСФ) на 7-е сутки в группе комбинированной терапии по сравнению с контролем. При этом уровни провоспалительных цитокинов при использовании комбинированной терапии соответствовали уровням цитокинов при заживлении идентичных ран без иммунной супрессии. Это свидетельствует о потенциале комбинированной терапии в нормализации местного иммунного ответа на фоне иммунной супрессии, что, по-видимому, способствует своевременному разрешению стадии воспаления.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что сочетанное применение интерферона α-2b и GRC-ML07 усиливало раннюю антибактериальную защиту и способствовало своевременному завершению воспалительной фазы и переходу к регенерации тканей. Это открывает перспективы применения данной комбинации для лечения инфицированных ран у пациентов в условиях иммуносупрессии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-298

ФОТОПРОТЕКТОРНЫЕ И АНТИСЕНИЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ КОМБИНИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

PHOTOPROTECTIVE AND ANTI-SENESCENCE EFFECTS OF COMBINED PLANT EXTRACTS ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

Е. А. Абрамова, А. Ю. Прокопов, И. В. Рыбина, Г. П. Слесарев

ООО «РОС-Химия», Екатеринбург

E. A. Abramova, A. Y. Prokopov, I. V. Rybina, G. P. Slesarev

ROS-Chimia LTD, Yekaterinburg

✉ e.abramova@ros-chimia.ru

Аннотация

Фотостарение кожи приводит к окислительному стрессу, мутациям ДНК и нарушению барьерных функций кожи. Экстракты африканского происхождения — Моринга (*Moringa oleifera*), Кигелия (*Kigelia africana*), Ройбуш (*Aspalathus linearis*) — и российского происхождения — Облепиха (*Hippophae rhamnoides*) — обладают антиоксидантным, противовоспалительным и репаративным действием. Их комбинация усиливает протекторное действие кожи и перспективна для косметики.

Abstract

Skin photoaging causes oxidative stress, DNA mutations, and barrier dysfunction. Extracts of African origin — Moringa (*Moringa oleifera*), Kigelia (*Kigelia africana*), Rooibos (*Aspalathus linearis*), and Russian origin Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) exhibit antioxidant, anti-inflammatory, and reparative effects. Their combination enhances skin protective properties and is promising for cosmetics.

Старение — сложный процесс, связанный с дисфункцией тканей и появлением дегенеративных изменений. В коже старение обусловлено внутренними и внешними факторами: временем (хронологический возраст), генетикой и окружающей средой. УФ-излучение является одним из наиболее вредных факторов для кожной ткани и приводит к трансформации здоровых клеток в сенильную форму [1]. Накопление сенильных клеток в коже, ранее считавшихся лишь побочным продуктом старения, теперь признано активным фактором старения и дисфункции, что подчеркивает необходимость разработки сенотерапевтических подходов для лечения и/или предотвращения возрастных изменений кожи и всего организма.

Выбор экстрактов Моринга, Кигелия, Ройбуш, Облепиха обусловлен их богатым составом биологически активных веществ, включая полифенолы, флавоноиды и витамины. Согласно теории ксеногормезиса [2], фитохимические соединения экзотических африканских растений активируют защитные клеточные пути, а комбинация с местной облепихой, богатой антиоксидантами (витамин С, каротиноиды), усиливает антиоксидантное и репаративное действие за счет синергетических эффектов. Для получения жидкофазных экстрактов применяли природные глубокие эвтектические растворители (NADES), обеспечивающие эффективное извлечение биоактивных соединений. Было изготовлено 3 типа экстрактов: моринга — облепиха, кигелия — облепиха, ройбуш — облепиха.

Для изучения биологического действия смесевых экстрактов использовали клеточную культуру первичных дермальных фибробластов человека (HdFb). Клетки выращивали в стандартной ростовой среде до достижения ими 90 % конфлюэнтности монослоя, затем клеточную культуру поместили в 96-луночные планшеты для оценки цитотоксичности и фотопротекторного действия экстрактов в различных концентрациях при помощи МТТ-теста. Для изучения сеноморфического действия экстрактов применяли разработанную модель индукции сенильного фенотипирования путем облучения УФ-Б-лучами в контролируемых условиях. Сеноморфическое и антиоксидантное действие оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и иммуноцитохимии (ИЦХ), анализируя маркеры старения (*p21, p16*), антиоксидантного ответа (*Nrf2, ROS*), воспаления (*IL-6, IL-8*).

Результаты МТТ-теста позволили установить, что растворы экстрактов в конечных концентрациях 0,0002–0,0015 % (2–15 мкг/мл) не проявляют цитотоксичности и при облучении 20 Дж/см^2 УФ-А и 2 Дж/см^2 УФ-Б оказывают фотопротекторное действие, поддерживая жизнеспособность клеток. Модель индукции клеточного старения подтверждает накопление белков *p21* и *p16*. В присутствии экстрактов сенильная трансформация клеток подавлялась, о чем свидетельствует отсутствие изменений размеров и морфологии клеток

© Е. А. Абрамова, А. Ю. Прокопов, И. В. Рыбина, Г. П. Слесарев, 2025

при воздействии на них ультрафиолетового излучения. Экстракты также проявляли антиоксидантное и противовоспалительное действие.

Синергия свойств фитохимических соединений африканских и российских экстрактов благоприятно повлияла на фотопротекторные и антисенильные эффекты в отношении дермальных фибробластов человека. Полученные данные подтверждают перспективность их применения в косметических средствах для защиты кожи от фотостарения.

Литература

1. Rinnerthaler M., Bischof J., Streubel M. K. et al. Oxidative stress in aging human skin // Biomolecules. 2015. Vol. 5. P. 545–589.
2. Howitz K. T., Sinclair D. A. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species // Cell. 2008. Vol. 133. P. 387–391.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-299

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ ПРОСТАТЫ В РАЗРЕШЕНИИ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК*

TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF CIRCULATING IMMUNE CELLS IN PROSTATE CANCER IN SINGLE CELL RESOLUTION

Э. Р. Акрамова, Ю. В. Шарифьянова, Д. Х. Гайнуллина, П. Н. Шмелькова, В. Н. Павлов, К. И. Еникеева

Лаборатории иммунологии Института урологии и клинической онкологии БГМУ, Уфа

E. R. Akramova, Yu. V. Sharifyanova, D. Kh. Gainullina, P. N. Shmelkova, V. N. Pavlov, K. I. Enikeeva

Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology BSMU, Ufa

✉ erakramova@bashgmu.ru

Аннотация

В настоящем исследовании с помощью секвенирования единичных клеток удалось выявить высокоэкспрессированные гены в периферических мононуклеарных клетках (PBMC) пациентов с раком простаты. В перспективе эти данные могут помочь выявить новые терапевтические и диагностические мишени, а также разработать стратегии комбинированной терапии для более эффективного лечения рака простаты.

Abstract

In this study, scRNA-seq was used to identify highly expressed genes in peripheral mononuclear cells of patients with prostate cancer. In the future, these data may help identify new therapeutic and diagnostic targets, as well as develop combination therapy strategies for more effective treatment of prostate cancer.

Рак предстательной железы (РПЖ) — второе по распространенности онкозаболевание у мужчин. Из-за высокой гетерогенности опухоли традиционное объемное РНК-секвенирование (bulk RNA-seq) не всегда точно отражает биологические характеристики РПЖ. Однако одноклеточное РНК-секвенирование (scRNA-seq) анализирует транскриптом тысяч отдельных клеток, раскрывая клеточную гетерогенность, межклеточные взаимодействия и особенности микроокружения опухоли. Выявляя молекулярные сигнатуры, мы стремимся понять механизмы заболеваний, определить терапевтические мишени и улучшить диагностику.

Цель — исследовать транскриптомный профиль циркулирующих иммунных клеток у пациентов с раком простаты методом scRNA-seq.

Материалы и методы

В исследование были включены 4 пациента с гистологическим подтвержденным раком простаты, шкала Глисона не превышала 8 (4 + 4). Объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC-peripheral blood mononuclear cell). Подготовка библиотек для проведения секвенирования единичных клеток осуществлялась с использованием системы Chromium Single Cell 3’ v2 от компании 10X Genomics со строгим соблюдением рекомендаций производителя. Секвенирование проводилось на платформе Illumina NextSeq2000 согласно стандартным протоколам. Биоинформатический анализ дифференциальной экспрессии проводился с помощью программных обеспечений Seurat и DESeq2 в программе R. Всего для анализа было получено 22 779 высококачественных клеток и 30 клеточных кластеров.

Результаты и обсуждение

Метод секвенирования единичных клеток (scRNA-seq) выявил 16 кластеров иммунных клеток в образцах PBMC пациентов с раком простаты, стандартизируя уровни экспрессии специфичных генов-маркеров. Наибольшее количество клеток находилось в кластерах моноцитов, Т- и В-ассоциированных клеток, а также естественных киллеров. В результате анализа дифференциальной экспрессии генов единичных клеток образцов пациентов с РПЖ был выявлен ряд высокоэкспрессированных генов. Стоит отметить, что ген IL32, задействованный в инвазии опухолевых клеток при раке простаты, высоко экспрессировался в кластерах клеток CD4, CD8, gdT, MAIT. Ген CCL5, экспрессировавшийся в CD8 TEM, CD4 CTL, NK клетках, кодирует хемоаттрактанты для моноцитов крови, Т-хелперов и эозинофилов, установлено, что экспрессия хемокина CCL5 положительно коррелирует

* Исследование выполнено в рамках Программы стратегического академического лидерства БГМУ «Приоритет-2030».

© Э. Р. Акрамова, Ю. В. Шарифьянова, Д. Х. Гайнуллина, П. Н. Шмелькова, В. Н. Павлов, К. И. Еникеева, 2025

с плохими прогностическими показателями у пациентов с РПЖ. В популяции клеток pDC и ILC был выявлен ген TNFRSF21 — рецептор смерти, способствующий метастазированию и обладающий высоким уровнем экспрессии в группах с высоким уровнем Глисона. В кластерах клеток CD4 выявлен ген IL7R, участвующий в формировании функционального рецептора интерлейкина 7 (IL-7). Исходя из литературных источников отмечалось, что у пациентов с ранней стадией РПЖ экспрессия гена IL-7 оказалась повышена. В NK клетках был идентифицирован ген CCL5, который кодирует хемоаттрактанты для моноцитов крови, Т-хелперов и эозинофилов. Также было отмечено, что экспрессия хемокина CCL5 положительно коррелирует с плохими прогностическими показателями у пациентов с РПЖ. Гены EBF1, PAX5, LINC00926 и CD79A продемонстрировали схожую высокую экспрессию в клетках В-памяти, промежуточных и наивных В-клетках. В 2024 г. исследование, проведенное Chenling и соавт., показало, что повышенная экспрессия PAX5 подавляет уровень белков MMP2 и MMP9, которые играют ключевую роль в процессах инвазивного роста клеток и метастазировании при РПЖ. Ген CST3, обнаруженный в дендритных клетках первого (cDC1) и второго (cDC2) типов, служит биомаркером для оценки функции почек и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний. Исследования образцов крови пациентов с РПЖ показали, что уровень экспрессии гена цистатина С остается на высоком уровне.

Заключение

В ходе анализа мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с раком предстательной железы с помощью метода single-cell RNA-секвенирования был выявлен ряд высокоэкспрессированных генов: IL32, CCL5, TNFRSF21, IL7R, EBF1, PAX5, LINC00926, CD79A и CST3, которые играют важную роль в развитии, прогрессировании и агрессивности опухоли. Эти гены также предоставляют ценную информацию о механизмах уклонения от иммунного ответа, регуляции цитоскелета и реакциях на окислительный стресс, что может свидетельствовать о перспективе терапевтического нацеливания на эти генные сигнатуры и диагностическом потенциале.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-300

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ АГОНИСТОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА (SEGRA) НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ *

EFFECT OF SELECTIVE GLUCOCORTICOID RECEPTOR AGONISTS ON THE CELL COMPOSITION AND EXTRACELLULAR MATRIX IN MOUSE BRAIN TISSUE

С. Д. Аладьев, Д. К. Соколов, М. О. Политко, Э. В. Григорьева

НИИ молекулярной биологии и биофизики ФИЦ ФТМ, Новосибирск

S. D. Aladev, D. K. Sokolov, M. O. Politko, E. V. Grigorieva

Research Institute of Molecular Biology and Biophysics FRC FTM, Novosibirsk

✉ s.aladev@alumni.nsu.ru

Аннотация

Длительное применение глюкокортикоидов (ГК) вызывает побочные эффекты. SEGRA могут являться менее токсичной заменой стероидным ГК. Было изучено противоотечное влияние SEGRA (CpdA, CpdA-03) и их влияние на астроциты и компоненты внеклеточного матрикса нормальной ткани головного мозга методами вестерн-блот, ОТ-ПЦР, окраски альциановым синим, дот-блот. Было показано, что CpdA-03 является наиболее перспективным препаратом для дальнейшего изучения.

Abstract

Long-term use of glucocorticoids (GC) causes side effects. SEGRA may be a less toxic replacement for steroid GCs. The anti-edematous effect of SEGRA (CpdA, CpdA-03) and their effect on astrocytes and extracellular matrix components of normal brain tissue were studied using Western-blot, RT-PCR, Alcian blue staining, and dot-blot. CpdA-03 was shown to be the most promising drug for further study.

Стероидные глюкокортикоиды (ГК) применяется при лечении различных заболеваний, таких как глиобластома, рассеянный склероз и др. ГК обладают хорошим противовоспалительным и противоопухолевым действием, но имеют ряд побочных эффектов. Действие ГК основано на механизме трансрепрессии глюкокортикоидного рецептора (GR), который обеспечивает противовоспалительное действие, и механизме трансактивации GR, связанном с побочными эффектами. Нестероидные селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора SEGRA, такие как CpdA и CpdA-03, могут обладать лучшим противовоспалительным действием при меньших побочных эффектах за счет активации механизма трансрепрессии GR. Соединение A (Compound A, CpdA) впервые было выделено из кустарника *Sutherlandia frutescens,* которое используется африканскими племенами как противозачаточное и противовоспалительное средство [1]. Недавно были изучены модификации CpdA (CpdA-01–08), обладающие большей химической стабильностью. Было показано, что соединение CpdA-03 в дозировке 7,5 мг/кг обладало хорошей противоопухолевой активностью, ингибируя рост лимфомы P388 на 78 % у мышей линии DBA/2, по сравнению с CpdA и дексаметазоном (Dex) [2]. Исходя из этих результатов для нашей работы были выбраны CpdA-03, CpdA, а также Dex в качестве контроля.

Влияние SEGRA на клеточный состав ткани головного мозга, в частности астроциты, на данный момент остается неизвестным. Работ о влиянии SEGRA на компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) ткани головного мозга в литературе также мало.

ВКМ головного мозга является уникальной структурой, поскольку преимущественно состоит из сложных молекул протеогликанов (ПГ) [3]. ПГ состоят из корового белка и углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ). ГАГ классифицируют на общие, сульфатированные и несульфатированные. К высокосульфатированным ГАГ относят хондроитинсульфат (ХС) и гепарансульфат (ГС) [4]. Известно, что обработка препаратом SEGRA AL-438 клеточных культур хондроцитов в концентрации 10^{-6} М снижала уровень мРНК ПГ аггрекана в 2,5 раза после 96 ч инкубации [5].

Целью этого исследования было изучение противоотечного действия соединений класса SEGRA (CpdA, CpdA-03) и их влияния на астроциты и экспрессию коровых белков ПГ (15 генов), ферментов биосинтеза ГС (13 генов), уровень содержания углеводных цепей ГАГ в нормальной ткани головного мозга мышей.

Мышам линии C57Bl/6 вводили 1 % каррагинан (50 мкл) в заднюю лапку в течение 1 ч, индуцируя отек. Затем мышам внутрибрюшинно вводили CpdA (7,5 мг/кг), CpdA-03 (7,5 мг/кг) и Dex (1 мг/кг). Срок выведения

* Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования ФИЦ ФТМ (проект № 125031203556-7).

© С. Д. Аладьев, Д. К. Соколов, М. О. Политко, Э. В. Григорьева, 2025

животных из эксперимента составлял 7,5 ч после индуцирования отека. Уровень содержания белка GFAP оценивали методом вестерн-блоттинг, уровень экспрессии коровых белков ПГ и ферментов биосинтеза ГС — ОТ-ПЦР в реальном времени, уровень содержания общих и высокосульфатированных молекул ГАГ — окраской альциановым синим с различным pH (pH = 1,0 для высокосульфатированных и pH = 2,5 для общих ГАГ соответственно), уровень содержания молекул ХС и ГС — дот-блот.

Все препараты обладали противоотечным действием. CpdA индуцировал появление минорной изоформы GFAP (44 kDa), которая ассоциирована с нейродегенеративными нарушениями. Этот результат подтверждает наше недавнее исследование [6] и работы других ученых [7, 8].

CpdA увеличивал уровень мРНК генов ПГ *Syndecan-3* (+2,5 раза), *Neurocan* (+2,75 раза), *Aggrecan* (+3 раза), *Biglycan* (+3,5 раза).

Общая транскрипционная активность генов системы биосинтеза ГС имела тенденцию к повышению при воздействии CpdA.

Введение CpdA снижало уровень содержания общих (−2,5 раза) и высокосульфатированных (−2 раза), CpdA-03 — высокосульфатированных (−3 раза), Dex — общих и высокосульфатированных (−2,8 раза) ГАГ. Тем не менее все препараты не вызывали статистически значимых изменений в содержании молекул ХС и ГС в нормальной ткани головного мозга мышей.

Таким образом, CpdA-03 обладал наименьшим воздействием на изучаемые параметры. Дальнейшее изучение противоотечных и противовоспалительных свойств CpdA-03 является перспективным, поскольку полученные результаты позволяют рассматривать его как вероятную замену стероидным ГК-препаратам.

Литература

1. Sergeant C. A., Africander D., Swart P. et al. Sutherlandia frutescens modulates adrenal hormone biosynthesis, acts as selective glucocorticoid receptor agonist (SEGRA) and displays anti mineralcorticoid properties // Journal of Ethnopharmacology. 2017. Vol. 202. P. 290–301.

2. Zhidkova E. V., Tilova L. R., Fetisov T. I. et al. Synthesis and anti cancer activity of the novel selective glucocorticoid receptor agonists of the phenylethanolamine series // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25. P. 8904.

3. Poole J. J. A., Mostaço Guidolin L. B. Optical microscopy and the extracellular matrix structure: a review // Cells. 2021. Vol. 10. P. 1760.

4. Karamanos N. K., Theocharis A. D., Pipergkou Z. et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix // FEBS Journal. 2021. Vol. 288. P. 6850–6912.

5. Owen H. C., Miner J. N., Ahmed S. F. et al. The growth plate sparing effects of selective glucocorticoid receptor modulator, AL 438 // Molecular and Cell Endocrinology. 2007. Vol. 264. P. 164–170.

6. Aladev S. D., Sokolov D. K., Politko M. O. et al. Dexamethasone effects on cell composition and myelin content in the mouse brain // Biocell. 2025. Vol. 49. P. 1057–1069.

7. Fujita K., Yamauchi M., Matsui T. et al. Increase of glial fibrillary acidic protein fragments in the spinal cord of motor neuron degeneration mutant mouse // Brain Research. 1998. Vol. 785. P. 31–40.

8. Fujita K., Kato T., Yamauchi M. et al. Increases in fragmented glial fibrillary acidic protein levels in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis // Neurochemical Research. 1998. Vol. 23. P. 169–174.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-301

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОРНК И ИХ РОЛЬ В ПРОГРЕССИИ РАКА ПРОСТАТЫ С ВЫСОКИМ РИСКОМ РЕЦИДИВА *

EPIGENETIC CHANGES IN MICRORNAS AND THEIR ROLE IN THE PROGRESSION OF PROSTATE CANCER WITH A HIGH RISK OF RECURRENCE

С. Х. Алибаков, Р. Р. Мухамадеев, Э. М. Кагирова, Д. Д. Асадуллина, М. Ф. Урманцев, В. Н. Павлов

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

S. Kh. Alibakov, R. R. Mukhamadeev, E. M. Kagirova, D. D. Asadullina, M. F. Urmantsev, V. N. Pavlov

Bashkir State Medical University, Ufa

✉ alibakov.salavat@gmail.com

Аннотация

Выявлены эпигенетические изменения микроРНК в опухоли простаты с высоким риском рецидива. Показано, что гиперметилирование miR-9-2, miR-1246, miR-138-1, miR-4669 и miR-129-1 приводит к активации онкогенных сигнальных путей, влияющих на агрессивность рака простаты и метастазирование.

Abstract

Epigenetic alterations of microRNAs were identified in prostate cancer with a high risk of recurrence. Hypermethylation of miR-9-2, miR-1246, miR-138-1, miR-4669, and miR-129-1 was shown to activate oncogenic signaling pathways associated with increased tumor aggressiveness and metastasis.

Введение

Рак простаты остается одной из ведущих причин онкологических заболеваний у мужчин. До 40 % пациентов с высоким риском по критериям RUSSCO сталкиваются с рецидивом в течение первых пяти лет. Эпигенетические изменения способствуют агрессивному течению болезни и развитию резистентности к терапии.

Методы

Использованы парные образцы опухолевой и нормальной ткани пациентов с раком простаты высокого риска рецидива (n = 8). Проведено WGBS на платформе Illumina NextSeq2000 с набором TruSeq Methyl Capture EPIC. Анализ данных выполнен с использованием TrimGalore, Bismark, MethylKit и HOMER.

Результаты

В ходе анализа дифференциального метилирования выявлено гиперметилирование 8 микроРНК: hsa-MIR-9-2HG, hsa-MIR-1246, hsa-MIR-4288, hsa-MIR-138-1, hsa-MIR-4669, hsa-MIR-129-1, hsa-MIR-4464 и hsa-MIR-1233-2.

Гиперметилирование miR-9-2 и miR-138 связано с активацией эпителиально-мезенхимального перехода и усилением инвазии. miR-129-1 регулирует онкогены и подавляет рост опухоли. miR-1246 вовлечена в ключевые сигнальные пути (Wnt/β-catenin, JAK/STAT, PI3K/AKT и др.), влияя на пролиферацию и стволовость. miR-4669 опосредованно регулирует экспрессию p53 и обладает супрессорной активностью.

Гиперметилированные микроРНК и их гены-мишени

miRNA	Известные гены-мишени, ассоциированные с раком простаты	Связь с раком простаты
hsa-MIR9-2HG	E-cadherin (*CDH1*), *SOCS5*, *MEF2C*	Да [1]
hsa-MIR-1246	*DYRK1A, RORα, THBS2, CADM1, AXIN2, GSK3β*	Да [2]
hsa-MIR-138-1	FAK (*PTK2*), β-catenin (*CTNNB1*), *BCR-ABL*, *CCND1, SOX4, HIF-1α*	Да [3]
hsa-MIR-4669	Регуляция PI3K-AKT, mTOR, p53, TGF-β сигнальных путей, COX-1/2	Да [4]
hsa-MIR-129-1	*ETV1* (онкоген), *BDKRB2, GRIN2D*	Да [5]

* Исследование выполнено за счет средств Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© С. Х. Алибаков, Р. Р. Мухамадеев, Э. М. Кагирова, Д. Д. Асадуллина, М. Ф. Урманцев, В. Н. Павлов, 2025

Выводы

У пациентов с раком простаты высокого риска рецидива выявлено гиперметилирование микроРНК с супрессорными функциями, что приводит к активации онкогенных путей (EMT, Wnt/β-catenin, PI3K/AKT) и усилению инвазивности опухоли. Обнаруженные микроРНК и их мишени представляют интерес как прогностические биомаркеры и потенциальные терапевтические мишени. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения их клинической значимости.

Литература

1. Akrami H., Karimi B., Salehi Z., Sisakhtnezhad S. The effect of ibuprofen on expression of Cox-1/2-related miRNAs in MKN-45-derived cancer stem-like cells // Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences. 2019. Vol. 8, No. 1. P. 18.

2. Ghafouri-Fard S., Khoshbakht T., Hussen B. M. et al. A review on the role of miR-1246 in the pathoetiology of different cancers // Frontiers in Molecular Biosciences. 2022. Vol. 8.

3. Tanaka K., Kawano M., Itonaga I. et al. Tumor suppressive microRNA-138 inhibits metastatic potential via the targeting of focal adhesion kinase in Ewing's sarcoma cells // International Journal of Oncology. 2016. Vol. 48, No. 3. P. 1135–1144.

4. Wang B., Wang L., Mao J. et al. Mouse bone marrow mesenchymal stem cells with distinct p53 statuses display differential characteristics // Molecular Medicine Reports. 2020.

5. Chen S., Lu C., Lin S. et al. A panel based on three-miRNAs as diagnostic biomarker for prostate cancer // Frontiers in Genetics. 2024. Vol. 15.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-302

ЭФФЕКТИВНАЯ ИНДУКЦИЯ КЛОНАЛЬНОЙ ЭКСПАНСИИ E7-СПЕЦИФИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК: МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПРОТОКОЛ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК *

EFFICIENT INDUCTION OF CLONAL EXPANSION OF E7-SPECIFIC T CELLS: A MODIFIED DENDRITIC CELL-BASED PROTOCOL

А. Алсаллум[1], Ю. А. Лопатникова[1], М. С. Фишер[1,2], Ю. А. Шевченко[1,2], Ю. Г. Филиппова[1], П. А. Шаньгина[1], С. В. Сенников[1]

[1]НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

A. Alsalloum[1], J. A. Lopatnikova[1], M. S. Fisher[1,2], J. A. Shevchenko[1,2], J. G. Filippova[1], P. A. Shangina[1], S. V. Sennikov[1]

[1]Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk
[2]I. M. Sechenov First Moscow State Medical University

✉ alaa.alsalloum19996@gmail.com

Аннотация

Рак шейки матки, ассоциированный с ВПЧ, остается серьезной проблемой. Иммуногенные эпитопы E6 и E7 ВПЧ представляют собой перспективные мишени для разработки TCR-Т-клеточной иммунотерапии. В данном исследовании был разработан протокол экспансии E7-специфичных CD8+-Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, нагруженных пептидом. Модификация протокола позволила увеличить количество антиген-специфических Т-клеток с 0,007 до 3 %.

Abstract

HPV-associated cervical cancer remains a significant global health challenge. The immunogenic epitopes E6 and E7 of HPV serve as promising targets for TCR-T cell immunotherapy. This study developed a protocol to expand E7-specific CD8+ T lymphocytes using peptide-loaded dendritic cells. Protocol optimization increased antigen-specific T cell frequency from 0.007 to 3 %.

Введение

Основной причиной развития рака шейки матки является хроническая инфекция высокоонкогенными штаммами вируса папилломы человека (ВПЧ), особенно типов 16 и 18, которые ответственны более чем за 70 % случаев заболевания [1]. Белки E6 и E7 ВПЧ являются ключевыми мишенями для терапевтического воздействия, поскольку они ингибируют опухолевые супрессоры p53 и pRb, что приводит к неконтролируемой пролиферации клеток [2]. Перспективным подходом является Т-клеточная терапия, основанная на TCR, который распознает эпитопы E6/E7, представленные главным комплексом гистосовместимости (MHC), что инициирует активацию Т-клеток и последующее уничтожение инфицированных клеток [3]. Кроме того, современные исследования показывают, что комбинация TCR-терапии с иммунотерапевтическими препаратами, такими как ингибиторы контрольных точек (например, анти-PD-1), может значительно повысить ее эффективность [4].

Цель исследования — разработать технологию формирования специфического поликлонального иммунного ответа с помощью дендритных клеток для индукции клонов E7- специфических цитотоксических Т-лимфоцитов с широким спектром аффинностей.

Материалы и методы

Для проведения анализа исходного содержания антиген-специфических клеток в периферической крови условно здоровых доноров и выбора наиболее подходящих доноров было проведено определение изотипа *HLA-A*02:01 у добровольцев с помощью метода проточной цитометрии. Для выполнения анализа уровня содержания антиген-специфических клеток использовались реагенты Flex-T™ (Biolegend) и синтезированный пептид $E7_{11-19}$(YMLDLQPET). Оценка эффективности замены UV-лабильного пептида на пептид E7 проводилась с помощью ИФА. Окрашивание клеток тетрамерами проводилось согласно оптимизированному протоколу производителя, анализ выполнялся на проточном цитофлуориметре Attune. Дендритные клетки условно здоровых доноров были получены по протоколу, разработанному ранее в лаборатории [5], с внесением дополнительных модифика-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00070).

© А. Алсаллум, Ю. А. Лопатникова, М. С. Фишер, Ю. А. Шевченко, Ю. Г. Филиппова, П. А. Шаньгина, С. В. Сенников, 2025

ций. Оценка фенотипа дендритных клеток в протоколе нагрузки иммуногенными пептидами антигена Е7 ВПЧ проводилась с помощью меченных флуорохромами антител и проточной цитометрии.

Результаты

Оптимизированный протокол для получения тетрамеров для идентификации Т-клеточных рецепторов, распознающих пептид белка Е7, позволил получить реагенты для окрашивания с эффективностью 85 % замены UV-лабильного пептида. С использованием данных реагентов на основании первичного скрининга из 10 человек, несущих HLA-A02:01, были выбраны 4 условно здоровых донора с наиболее высоким уровнем исходного содержания Е7-специфических цитотоксических лимфоцитов. В протокол получения и нагрузки дендритных клеток пептидом Е7 ВПЧ выли внесены изменения (увеличение дозы пептида для нагрузки и дополнительная нагрузка пептидом лимфоцитов), позволившие увеличить количество CD8+-антиген-специфических клеток, распознающих пептид Е7 в комплексе с HLA в среднем до 3 % (при исходных 0,007 %).

Выводы

Разработанный протокол индукции клональной экспансии Е7-специфических Т-клеток обеспечил увеличение их количества более чем в 400 раз, что подтверждает его эффективность для генерации антиген-специфического иммунного ответа.

Литература

1. Doorbar J. et al. The biology and life cycle of human papillomaviruses // Vaccine. 2012. Vol. 30. P. F55–F70.

2. Shillitoe E. J. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy // Cancer Gene Therapy. 2006. Vol. 13. P. 445–450.

3. Jin B. Y. et al. Engineered T cells targeting E7 mediate regression of human papillomavirus cancers in a murine model // JCI Insight. 2018. Vol. 3.

4. Shafer P., Kelly L. M., Hoyos V. Cancer therapy with TCR engineered T cells: current strategies, challenges, and prospects // Frontiers in Immunology. 2022. Vol. 13. P. 835762.

5. Sennikov S. et al. Modified dendritic cell based T cell expansion protocol and single cell multi omics allow for the selection of the most expanded and in vitro effective clonotype via profiling of thousands of MAGE A3 specific T cells // Frontiers in Immunology. 2024. Vol. 15. P. 1470130.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-303

МЕТАБОЛОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ЯЗВОЙ СТОПЫ*

SERUM METABOLOMIC PROFILING REVEALS POTENTIAL BIOMARKERS OF DIABETIC FOOT ULCERS

А. А. Анудариева[1,2], Ю. П. Центалович[1], В. В. Яньшоле[1,2]

[1] *Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный университет*

A. A. Anudarieva[1,2], Yu. P. Tsentalovich[1], V. V. Yanshole[1,2]

[1] *International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ anudarieva.a@tomo.nsc.ru

Аннотация

Диабетическая язва стопы — тяжелое осложнение сахарного диабета, которое часто приводит к ампутациям нижних конечностей. Мы исследовали липидный профиль сыворотки крови диабетических пациентов с язвой и без язвы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС). По результатам статистической обработки данных мы выявили группу метаболитов, перспективных для ранней диагностики диабетической язвы стопы.

Abstract

Diabetic foot ulcer is a severe complication of diabetes mellitus that often leads to lower limb amputations. We investigated the lipid profile of blood serum in diabetic patients with and without ulcers using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS). Statistical analysis of the data revealed a group of metabolites with potential utility for early diagnosis of diabetic foot ulcers.

В настоящее время в связи с отсутствием обнаруженных предиктивных маркеров диабетическая язва стопы диагностируется исключительно при наличии клинических проявлений. Анализ данных метаболома, в частности определение и идентификация отличительных для изучаемого осложнения соединений в биологических образцах, позволяет выявить вещества, изменения концентраций которых отражает течение патологических процессов. В данном исследовании мы сосредоточились на выявлении маркеров диабетической язвы стопы и изучении метаболических особенностей, ассоциированных с развитием этого осложнения. Полученные данные не только позволяют оценить риск развития язвенного поражения задолго до его клинической манифестации, но и способствуют пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе патологического процесса. В рамках проведенной нами работы использовались образцы, полученные от 21 пациента с сахарным диабетом 2-го типа и с диабетической язвой стопы, а также от 17 пациентов с диабетом, но без осложнений. Данные для анализа были получены с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) липидной фракции сыворотки крови. В работе применялось ПО Peakonly, ранее разработанное в нашей лаборатории, которое позволяет предварительно выделить «признаки», несущие в себе данные о массе и времени выхода молекул с хроматографической колонки. В результате первичной обработки данных было выделено 4809 признаков, которые в дальнейшем анализировались с помощью специализированных библиотек для языка Python (SciPy, Sklearn, Statsmodels).

Отбор перспективных признаков, ассоциированных с развитием диабетической язвы стопы, проводился на основе результатов одномерного и многомерного анализов: определялись уровни статистической значимости различий между группами с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни (p-value), метрики кратности изменения (Foldchange), значимость переменной в проекции (VIP-score) по результатам метода OPLSDA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis). Кроме того, мы также использовали метрики ROC-AUC для таких методов машинного обучения, как Random Forest, Support Vector Machine, PLSDA (Partial Least Squares Discriminant Analysis). Комбинация этих методов позволила отобрать 55 признаков, демонстрирующих наибольшую дифференцирующую способность между группами пациентов с диабетической язвой и без нее. Далее вы-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-14-00035).

© А. А. Анудариева, Ю. П. Центалович, В. В. Яньшоле, 2025

деленные признаки подверглись анализу MS- и MS/MS-спектров, а также аннотации по базам данных HMDB (Human metabolome database), LIPID MAPS. В итоге нам удалось отнести метаболиты к таким классам соединений, как фосфолипиды, триглицериды, сфингомиелины, фосфатидилхолины, церамиды, стеролы и др. В качестве последующей работы предполагается идентификация метаболических путей с целью выявления молекулярных основ развития диабетической язвы стопы, а также расширение анализа на водорастворимую метаболомную фракцию, полученную от той же когорты пациентов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-304

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛА РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ГЛИОМ

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUSES FOR GLIOMA THERAGNOSTIC

Е. Д. Баженов[1], Н. С. Васильева[1], А. Б. Агеенко[1], Г. В. Кочнева[2]

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

E. D. Bazhenov[1], N. S. Vasilyeva[1], A. B. Ageenko[1], G. V. Kochneva[2]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ e.bazhenov@g.nsu.ru

Аннотация

Глиомы — одни из наиболее агрессивных и злокачественных опухолей центральной нервной системы (ЦНС). В настоящее время онколитические вирусы являются одним из наиболее перспективных направлений разработки новых терапевтических агентов против глиом. Однако необходимо исследование вклада секретируемых вирусами трансгенов для понимания механизма их действия и выбора оптимальных схем терапии.

Abstract

Glioma is one of the most aggressive and malignant tumor of the central nervous system. Currently, oncolytic viruses are one of the most promising areas for the development of new therapeutic agents against gliomas. However, it is necessary to study the contribution of transgenes secreted by viruses in order to understand the mechanism of their action and choose optimal treatment regimens.

Несмотря на то что опухоли головного мозга довольно редки, они относятся к наиболее тяжелым по последствиям онкологическим заболеваниям. Глиомы высокой степени злокачественности являются одними из самых распространенных и наиболее агрессивных типов опухолей ЦНС и обладают высокой резистентностью к различным терапевтическим методам.

Одним из наиболее перспективных подходов иммунотерапии злокачественных новообразований является виротерапия. Вирус осповакцины обладает естественным тропизмом к клеткам тканей различного гистогенеза за счет отсутствия зависимости от специфических рецепторов для проникновения в клетку. Более того, размер генома вируса осповакцины позволяет встраивать в него трансгены для усиления противоопухолевого эффекта вирусного вектора. В ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора были разработаны рекомбинантные штаммы вируса осповакцины, несущие трансгены онкотоксических белков апоптина (Apo) и NS1 парвовируса H-1 и мышиного симпортера натрия/йодида mNIS, экспрессируемого под контролем раннего или позднего вирусного промотора. Белки Apo и NS1 активируют апоптоз опухолевых клеток, а mNIS обеспечивает накопление радиоактивных изотопов йода в опухолевых клетках для радиойодтерапии и визуализации опухоли и метастазов.

В данной работе проведена оценка цитотоксической активности рекомбинантов VV-mNIS-NS1/VV-P11mNIS-NS1, VV-mNIS-dGF/VV-P11mNIS-dGF, VV-mNIS-Apo/VV-P11mNIS-Apo в отношении клеток иммортализованных линий (U87 MG и U343 MG) и культур глиом человека (BR2.20, BR3.20, BR5.21, BR6.21 и LowGG), полученных из образцов опухолей, колориметрическим методом. Также проведен анализ уровней представленности mNIS на поверхностных мембранах клеток U343 MG и U87 MG, инфицированных исследуемыми рекомбинантами, и апоптотических процессов, индуцированных в популяции опухолевых клеток под действием онколитических вирусов методом проточной цитометрии.

Показано, что рекомбинанты без инсерции генов онкотоксических белков (VV-mNIS-dGF и VV-P11mNIS-dGF) обладают наименьшей литической активностью в отношении клеток глиом человека. При этом рекомбинанты, экспрессирующие mNIS под контролем раннего вирусного промотора (VV-mNIS-NS1, VV-mNIS-Apo, VV-mNIS-dGF), более цитотоксичны для клеток глиом человека. Все исследуемые культуры клеток глиом обладают высокой чувствительностью к действию вируса VV-mNIS-NS1.

© Е. Д. Баженов, Н. С. Васильева, А. Б. Агеенко, Г. В. Кочнева, 2025

При цитометрическом анализе зарегистрирована эффективная транслокация mNIS на поверхностной мембране клеток U343 MG и U87 MG через 24 ч после инфекции всеми рекомбинантными вирусами. При этом наибольшее количество NIS-положительных клеток выявляется при обработке опухолевых клеток рекомбинантом VV-P11mNIS-Apo, а наименьшее — при инфекции вирусом VV-mNIS-NS1.

Анализ процессов клеточной гибели, запускаемых в клетках глиобластомы человека U87 MG под действием онколитических вирусов VV-mNIS-NS1, VV-P11mNIS-NS1, VV-mNIS-Apo, VV-P11mNIS-Apo, VV-mNIS-dGF, VV-P11mNIS-dGF, показал, что все исследуемые рекомбинанты способны индуцировать программу апоптоза в опухолевых клетках, при этом большее количество живых клеток регистрируется при обработке рекомбинантом VV-P11mNIS-Apo.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-305

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ЛАНДШАФТ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ: СОЗДАНИЕ БИОКОЛЛЕКЦИИ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ОНКОЛОГИИ *

THE MOLECULAR LANDSCAPE OF SOLID TUMORS: CREATION OF BIOCOLLECTION AND NEXT GENERATION SEQUENCING FOR PERSONALIZED ONCOLOGY

А. А. Баландина[1], М. Ю. Донников[1], А. В. Морозкина[1], А. А. Аксарин[2], В. Е. Видуто[2]

[1] *Сургутский государственный университет*
[2] *Сургутская окружная клиническая больница*

A. A. Balandina[1], M. Yu. Donnikov[1], A. V. Morozkina[1], A. A. Aksarin[2], V. E. Viduto[2]

[1] *Surgut State University*
[2] *Surgut Regional Clinical Hospital*

✉ limonakae@mail.ru

Аннотация

Использование технологии NGS для обнаружения значимых генетических изменений в опухоли дает возможность получить полную картину молекулярных характеристик новообразования, что позволяет создать действенную терапевтическую стратегию. Нами представлен спектр патогенных вариантов, обнаруженных в образцах тканей солидных опухолей пациентов ХМАО-Югры, проходивших диагностику и лечение в Сургутской окружной клинической больнице в 2023–2024 гг.

Abstract

The use of NGS technology for detecting significant genetic alterations in tumors allows for a comprehensive understanding of the molecular characteristics of the neoplasm, enabling the development of an effective therapeutic strategy. We present a spectrum of pathogenic variants identified in tissue samples from solid tumors of patients from the Khanty-Mansi Autonomous Okrug — Yugra, who underwent diagnosis and treatment at the Surgut Regional Clinical Hospital in 2023–2024.

Персонализированный подход в онкологии способствует достижению благоприятного исхода заболевания, значительно меняя тактику лечения онкологических пациентов. Современные исследования идентифицировали около 140 генов, мутации в которых могут инициировать или поддерживать онкогенез. В среднем злокачественная опухоль содержит 2–8 таких «драйверных» мутаций, тогда как остальные изменения не влияют на пролиферативную активность клеток. Драйверные гены объединены в 12 ключевых сигнальных путей, контролирующих три фундаментальных процесса: определение клеточной дифференцировки, регуляцию апоптоза, стабильность генома. Изучение этих механизмов и корреляция влияния генотипического разнообразия мутаций в солидных опухолях остается приоритетным направлением персонализированной онкологии для разработки стратегий, направленных на снижение заболеваемости и улучшение выживаемости пациентов.

Целью работы являлось создание биоколлекции с образцами тканей солидных опухолей на базе лаборатории «Биобанк Югры» при Сургутском университете, а также изучение молекулярно-генетического ландшафта и прогностической значимости патогенных вариантов (мутаций), выявленных с применением технологии NGS. Мутации выявлялись методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием набора «HELICON Атлас Плюс» (ОнкоАтлас, Россия) на секвенаторе DNBSEQ G50RS (MGI, KHP). Анализ данных и интерпретация результатов выполнены с помощью ПО Solo AVES (ОнкоАтлас, Россия).

Результаты

В биоколлекцию вошли образцы солидных опухолей (блоки FFPE и замороженные свежие фрагменты), полученные от 44 пациентов в возрасте 35–83 года с диагнозами (МКБ-10): колоректальный рак (С18.2-9, С19, С20) — 26 образцов, рак легкого (С34.1-2) — 3 обр., меланома (С43.5-7) — 8 обр., рак щитовидной железы (С73) — 4 обр. Список выявленных мутаций представлен в таблице.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-574-05.

© А. А. Баландина, М. Ю. Донников, А. В. Морозкина, А. А. Аксарин, В. Е. Видуто, 2025

Характеристика и частота выявленных мутаций

HGVS (cDNA)	HGVS белок	dbSNP (rs)	Тип	Клин. знач.	Кол-во	COSMIC ID
NRAS						
c.34G>T	p.G12C	rs121913529	Миссенс	P	2	562
c.34G>A	p.G12S	rs121913530		P	2	563
c.35G>A	p.G12D	rs121913529		P	2	564
c.37G>C	p.G13R	rs121913531		P	1	569
c.38G>A	p.G13D	rs112445441		P	2	573
c.181C>A	p.Q61K	rs121434595		P	1	580
c.182A>T	p.Q61L	rs121434596		P	1	583
c.182A>G	p.Q61R	rs11554290		P	1	584
KRAS						
c.35G>A	p.G12D	rs121913529	Миссенс	P	2	521
c.35G>C	p.G12A	rs121913530		P	1	522
c.34G>C	p.G12R	rs587781822		P	1	518
c.35G>T	p.G12V	rs121913529		P	1	520
c.34G>A	p.G12S	rs121913534		P	2	517
c.34G>T	p.G12C	rs121913529		P	2	516
c.38G>A	p.G13D	rs112445441		P	2	532
EGFR						
c.2235_2249del	p.E746_A750del	rs121913421	inframe del	P	1	6223
c.2240T>C	p.L747S		Миссенс	P	1	26704
c.2573T>G	p.L858R	rs121434568		P	2	6224
c.2573_2574del insGT	p.L858R	rs1057519848		P	1	12429
BRAF						
c.1799T>A	V600E	rs113488022	Миссенс	P	16	

Примечание: P — патогенный вариант; del — делеция.

Из 44 образцов методом NGS были выявлены клинически значимые варианты, при этом наиболее часто мутировали гены *BRAF, KRAS, NRAS, EGFR*. Диагностическая эффективность при основных типах опухолей была следующей: рак ободочной кишки (47,7 %) — 19 случаев (C18.7 — 6 случаев), меланома кожи (18,2 %) — 8 случаев, рак прямой кишки (11,4 %) — 5 случаев, рак легкого (11,4 %) — 5 случаев, рак щитовидной железы (9,1 %) — 4 случая, неуточненный рак (2,3 %) — 1 случай.

Понимание механизма мутаций в зависимости от вида и локализации дает ценные прогностические данные для подбора наиболее эффективного препарата таргетной терапии. Было выявлено 12 пациентов с мутациями в *KRAS* и 11 в *NRAS*, которые опосредуют резистентность пациентов к ингибиторам EGFR, делая нецелесообразным использование цетуксимаба и панитумумаба. Вследствие того, что опухоли с мутациями в *EGFR* чувствительны к ингибиторам EGFR, 5 пациентов могут получать терапию препаратами гефитиниб, эрлотиниб, осимертиниб. Для 16 пациентов с мутацией в *BRAF* эффективными станут препараты-мишени ингибиторов BRAF — дабрафениб и вемурафениб.

Таким образом, использование точных диагностических методов позволяет перейти на региональном уровне к персонализированной медицине, основанной на доказательствах и индивидуальных генетических особенностях каждого клинического случая, что способствует улучшению диагностики и прогноза заболевания для пациентов с солидными опухолями.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-306

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ФРАГМЕНТА АНТИТЕЛА ПРОТИВ HTMEPAI, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ КРЫСИНОЙ ГИБРИДОМЫ

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A SINGLE-CHAIN VARIABLE FRAGMENT AGAINST HTMEPAI OBTAINED FROM RAT HYBRIDOMA

К. О. Баскакова[1], П. К. Кузьмичев[2], И. П. Охрименко[2], М. С. Карбышев[1,3]

[1]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва
[2]Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[3]Московский политехнический университет, Москва

K. O. Baskakova[1], P. K. Kuzmichev[2], I. P. Okhrimenko[2], M. S. Karbyshev[1,3]

[1]N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[2]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
[3]Moscow Polytechnic University

✉ christina.baskakova@gmail.com

Аннотация

Получены препараты анти-hTMEPAI одноцепочечных антител (scFv) из клеток гибридом крысы с использованием гетерологичной системы экспрессии в *E. coli*. Созданные scFv продемонстрировали высокую аффинность к рекомбинантному hTMEPAI, ресолюбизированному в детергенте, а также к нативной версии целевого антигена. Полученные результаты подтверждают перспективность применения scFv для дальнейших структурно-функциональных исследований hTMEPAI в мембраноподобных условиях.

Abstract

Anti-hTMEPAI single-chain antibodies (scFv) were obtained from rat hybridoma cells using a heterologous expression system in *E. coli*. The scFv demonstrated high affinity for recombinant hTMEPAI solubilized in detergent, as well as for the native version of the target antigen. The results confirm the promise of using scFv for further structural and functional studies of hTMEPAI in membrane-like conditions.

Белок hTMEPAI (transmembrane prostate androgen-induced protein 1) является перспективным биомаркером и возможной мишенью для разработки новых средств таргетной иммунотерапии солидных злокачественных новообразований, так как вовлечен в процессы злокачественной трансформации и прогрессии [1]. Разработка антител к интегральным мембранным белкам затруднена ввиду структурных особенностей и сложностей получения [2]. Одноцепочечные вариабельные фрагменты антител (scFv) представляют собой удобный формат для применения в диагностических целях благодаря небольшому размеру и простоте наработки в гетерологичных системах экспрессии.

Для получения препаратов рекомбинантных анти-TMEPAI scFv вариабельные домены тяжелых и легких цепей, полученные из клеток гибридомы крысы [3], амплифицировали методом ПЦР и субклонировали в вектор pET-28a (+) для дальнейшей периплазматической экспрессии в клетках *E. coli* Shuffle T7 [4]. Полученный в бесклеточной белоксинтезирующей системе целевой антиген (hTMEPAI изоформа 1) ресолюбизировали в различных детергентах для скрининга оптимальных условий. Функциональную характеристику полученных scFv антител осуществляли при помощи поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и тестов на клетках-оверэкспрессорах HEK293.

Средний выход рекомбинантных анти-TMEPAI scFv-фрагмента при наработке в *E. coli* Shuffle T7 составил 10,2 ± 0,5 мг/л бактериальной культуры. Анализ гомогенности препаратов методом гель-фильтрации, подтвердил, что больше 95 % очищенного белка находится в мономерной форме, что подтверждается отсутствием значительных пиков, характерных для агрегации.

Аналитическая ресолюбилизация антигена в различных детергентах (SDS, Triton X-100, Fos-12, MNG-OG, Brij535, b-OG, LPPG) позволила определить, что в присутствии MNG-OG и Fos-12 целевой белок — hTMEPAI — переходил в растворимую фракцию более чем на 80 %.

© К. О. Баскакова, П. К. Кузьмичев, И. П. Охрименко, М. С. Карбышев, 2025

Функциональная активность препаратов scFv-антител была оценена с помощью SPR, подтвердившей специфическое связывание с hTMEPAI при KD 1,2 ± 0,3 нМ в присутствии MNG-OG. Также с помощью проточной цитометрии в клеточных тестах с использованием линии HEK293 наблюдалось эффективное связывание scFv.

Таким образом, полученные препараты scFv обладают высокой специфичностью и антигенсвязывающей активностью в отношении hTMEPAI, что делает их перспективными инструментами для дальнейших структурно-функциональных исследований.

Литература

1. Karbyshev M. S. et al. Development of novel monoclonal antibodies for evaluation of transmembrane prostate androgen-induced protein 1 (TMEPAI) expression patterns in gastric cancer // Pathology & Oncology Research. 2018. Vol. 24. P. 427–438.

2. Zhang C. Y. et al. Database study on the expression and purification of membrane proteins // Protein & Peptide Letters. 2021. Vol. 28, No. 9. P. 972–982.

3. Rottach A. et al. Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for PCNA // Hybridoma (Larchmont). 2008. Vol. 27, No. 2.

4. Breitling F., Dübel S. Cloning and expression of single-chain fragments (scFv) from mouse and rat hybridomas // Methods in Molecular Medicine. 1998. Vol. 13.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-307

КОМБИНАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПРОБОПОДГОТОВКИ КЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗЦОВ И АНАЛИТИЧЕСКОГО ПОДХОДА ДЛЯ ТАРГЕТИРОВАННОГО МЕТАБОЛОМНОГО СКРИНИНГА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

THE COMBINATION OF CELL SAMPLE PREPARATION PROTOCOL AND ANALYTICAL APPROACH FOR TARGETED METABOLOMIC SCREENING USING LC-MS/MS

Н. В. Басов[1,2], А. Д. Рогачев[1,2], Е. А. Бутикова[3], М. А. Сотникова[1–3], Ю. С. Сотникова[2,4], Ю. В. Патрушев[2,4], М. А. Мельченко[1,2], И. А. Разумов[5], Н. Ф. Салахутдинов[2], А. Г. Покровский[1]

[1]Новосибирский государственный университет
[2]Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
[3]НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[4]Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН, Новосибирск
[5]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

N. V. Basov[1,2], A. D. Rogachev[1,2], E. A. Butikova[3], M. A. Sotnikova[1–3], Yu. S. Sotnikova[2,4], Yu. V. Patrushev[2,4], M. A. Melchenko[1,2], I. A. Razumov[5], N. F. Salakhutdinov[2], A. G. Pokrovsky[1]

[1]Novosibirsk State University
[2]N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS
[3]Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk
[4]Boreskov Institute of Catalysis, Novosibirsk
[5]Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ basov@nioch.nsc.ru

Аннотация

Разработан подход к метаболомному скринингу при использовании монолитной колонки и двух режимов ВЭЖХ. Также разработан и апробирован протокол пробоподготовки клеток, позволяющий проводить анализ образцов, содержащих материал от 10 000 клеток и более. Комбинация аналитического подхода и протокола пробоподготовки позволяет определять более 350 метаболитов за один анализ.

Abstract

An approach to metabolomic screening using a monolithic column and two LC modes was developed. We have also developed and tested a cell sample preparation protocol that allows us to analyze samples containing material from 10,000 cells or more. Combining the analytical approach with the sample preparation protocol enables the determination of over 350 metabolites in a single analysis.

Для анализа биологических молекул, таких как нуклеотиды, биогенные амины, аминокислоты и липиды, ввиду различий в их химических свойствах традиционно требуется разработка отдельных аналитических методик. Современные подходы к таргетированному метаболомному скринингу направлены на одновременное определение широкого спектра метаболитов за один анализ.

Ранее нами была синтезирована органическая монолитная колонка путем сополимеризации стирола, дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола. Поверхность сорбента одновременно содержит гидрофобные и донорно-акцепторные центры. Показано, что данная колонка с монолитным сорбентом может быть использована для скрининга метаболитов в режимах как обращенно-фазовой (ОФХ), так и гидрофильной хроматографии (ГФХ), а применение двух режимов хроматографирования при метаболомном скрининге является взаимно дополняющим и может способствовать увеличению охвата метаболитов из различных метаболических путей [1]. Благодаря устойчивости полимерного материала колонки к высокоосновным средам мы использовали элюенты А (20 мМ $(NH_4)_2CO_3$ + NH_3, pH = 9,8) и Б (ацетонитрил), переключая режимы ВЭЖХ без замены элюентов и колонки. Оптимизированный комбинированный градиент (ГФХ + ОФХ) длится 28 мин и обеспечивает детекцию более 400 метаболитов за один анализ.

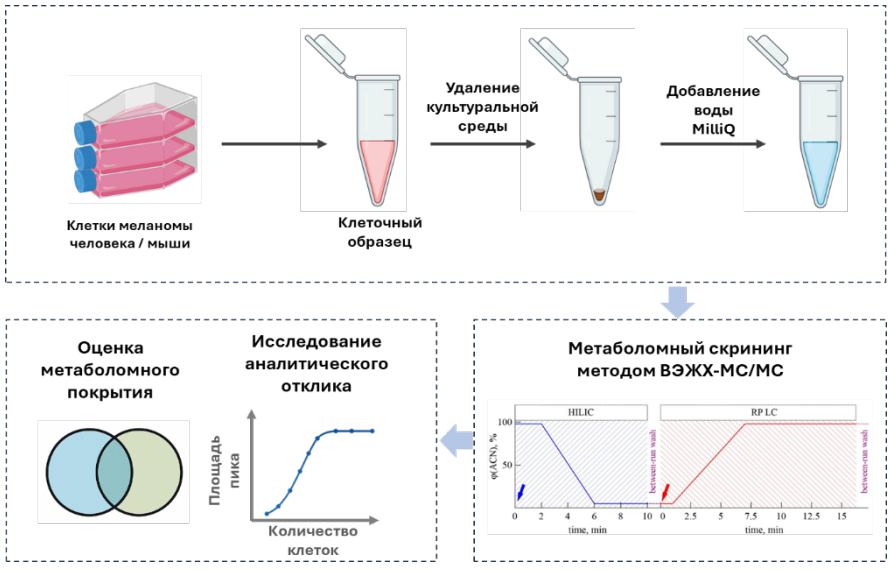
© Н. В. Басов, А. Д. Рогачев, Е. А. Бутикова, М. А. Сотникова, Ю. С. Сотникова, Ю. В. Патрушев, М. А. Мельченко, И. А. Разумов, Н. Ф. Салахутдинов, А. Г. Покровский, 2025

Эффективность подхода сравнивалась с методиками, основанными на использовании коммерчески доступных колонок [2]. Было показано, что число детектируемых метаболитов при анализе контрольного образца плазмы крови человека с использованием разработанного подхода было значительно больше, чем при использовании коммерчески доступных колонок. Предложенный аналитический подход, реализуемый на стандартной одномерной системе ВЭЖХ-МС/МС, сочетает широкий спектр детектируемых метаболитов и высокую скорость анализа. Он применим для метаболомного скрининга плазмы крови, клеточных культур и других биологических матриц, где необходим одновременный скрининг широкого спектра метаболитов из различных метаболических путей.

Разработка универсального протокола пробоподготовки для метаболомного анализа клеточных линий является важным этапом в исследовании метаболических изменений, происходящих в клетках под воздействием различных факторов, включая физические воздействия и ксенобиотики. В дополнение к аналитическому подходу к метаболомному скринингу был разработан и апробирован протокол пробоподготовки клеток. Комбинация протокола пробоподготовки и анализа обеспечивает надежное детектирование метаболитов в широком диапазоне концентраций клеточного материала, от 10 тыс. до 1 млн клеток в образце.

В работе были построены зависимости аналитического сигнала метаболитов от содержания клеток в образце. Так, анализ клеток линий SK-MEL-28 и B-16 показал, что оптимальное содержание клеток, необходимое для достижения максимального метаболомного покрытия, составляет 400–500 тыс. клеток. В этих условиях удалось идентифицировать до 220 метаболитов в режиме ГФХ и до 170 метаболитов в режиме ОФХ. Уменьшение количества клеток ниже 100 тыс. снижает чувствительность анализа, а увеличение свыше 500 тыс. не приводит к улучшению покрытия. Особое внимание было уделено влиянию размеров клеток на результаты анализа. Линия SK-MEL-28, характеризующаяся большим средним диаметром клеток (20–25 мкм) по сравнению с линией B16 (15–20 мкм), продемонстрировала более высокое метаболомное покрытие при одинаковом количестве клеток. Это объясняется большим объемом цитоплазмы и большей площадью поверхности клеточных мембран.

Данный протокол может быть модифицирован этапами сортировки клеток или специфическими модификациями для исследований отдельных клеточных субпопуляций, что расширит его применение в специализированных задачах. Таким образом, предложенная комбинация аналитического подхода и протокола пробоподготовки (см. рисунок) является перспективным инструментом для проведения широкого спектра биомедицинских исследований.



Ключевые этапы проведения метаболомного скрининга клеток

Литература

1. Басов Н. В., Рогачев А. Д. и др. Исследование хроматографического поведения метаболитов из плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола // Химия в интересах устойчивого развития. 2022. Т. 30, № 7. С. 591–598.

2. Basov N. V., Rogachev A. D., Aleshkova M. A. et al. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole // Talanta. 2024. Vol. 267. P. 125168.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-308

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ LRRK2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЕМ ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМНОЙ ГИДРОЛАЗЫ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ, НА ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ КЛЕТКАХ *

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF LRRK2 INHIBITORS IN DISEASES ASSOCIATED WITH LYSOSOMAL GLUCOCEREBROSIDASE DEFICIENCY USING PATIENT-SPECIFIC CELLS

К. С. Башарова[1], А. И. Безрукова[1,2], Г. В. Байдакова[3], И. В. Милюхина[2,4], Е. Ю. Захарова[3], С. Н. Пчелина[1,2], Т. С. Усенко[1,2]

[1]Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина
[2]Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
[3]Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва
[4]Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург

K. S. Basharova[1], A. I. Bezrukova[1,2], G. V. Baydakova[3], I. V. Miliukhina[2,4], E. Yu. Zakharova[3], S. N. Pchelina[1,2], T. S. Usenko[1,2]

[1]Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov, National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina
[2]Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
[3]N. P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow
[4]N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain RAS, Saint Petersburg

✉ kbasharova@yandex.ru

Аннотация

Болезнь Гоше (БГ) и GBA1-ассоциированная болезнь Паркинсона (GBA1-БП) обусловлены мутациями в GBA1 и сопровождаются изменением активности лизосомных гидролаз. В ходе исследования было оценено влияние ингибитора киназы LRRK2 на активность лизосомных гидролаз в макрофагах пациентов. Наиболее выраженный эффект наблюдался у пациентов с GBA1-БП с тяжелой мутацией p.L444P, что подчеркивает важность учета типа мутации при разработке таргетной терапии.

Abstract

Gaucher disease (GD) and GBA1-associated Parkinson's disease (GBA1-PD) are caused by mutations in the GBA1 gene and are accompanied by altered activity of lysosomal hydrolases. This study evaluated the effect of LRRK2 kinase inhibition on lysosomal hydrolase activity in patient-derived macrophages. The most pronounced effect was observed in GBA1-PD patients carrying the severe p.L444P mutation, highlighting the importance of considering mutation type when developing targeted therapies.

Введение

Болезнь Гоше (БГ) — наиболее распространенная лизосомная болезнь накопления, вызываемая биаллельными мутациями в гене *GBA1*, кодирующем лизосомную гидролазу глюкоцереброзидазу (GCase). Дефицит GCase ведет к накоплению глюкоцереброзида в макрофагах и нарушению лизосомного биогенеза. Гетерозиготные мутации в гене *GBA1* ассоциированы с развитием GBA1-ассоциированной болезни Паркинсона (GBA1-БП) — самой частой формы БП с известной генетической этиологией. Носительство мутаций в *GBA1* увеличивает риск БП в среднем в 8 раз. Мутации *GBA1* принято делить на «тяжелые» (например, p.L444P, p.R120W, p.Leu29fs (84GG)) и «легкие» (p.N370S, p.V394L, p.R463C) в зависимости от остаточной активности GCase. В настоящее время активно исследуются подходы к восстановлению активности GCase, включая фармакологические шапероны — малые молекулы, способствующие правильному фолдингу фермента. Кроме того, было показано, что ингибирование киназной активности LRRK2 может опосредованно повышать активность GCase, предположительно за счет улучшения ее транспорта в лизосомы [1, 2].

Цель — оценить влияние селективного ингибитора LRRK2 (MLi-2) на активность различных лизосомных гидролаз и концентрацию лизосфинголипидов, являющихся их субстратами, в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ и GBA1-БП в зависимости от тяжести мутаций в гене *GBA1*.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-15-00177).

© К. С. Башарова, А. И. Безрукова, Г. В. Байдакова, И. В. Милюхина, Е. Ю. Захарова, С. Н. Пчелина, Т. С. Усенко, 2025

Материалы и методы

В исследование включены пациенты с БГ (n = 7), GBA1-БП (n = 10: 6 — p.N370S, 4 — p.L444P) и контроль (n = 12). Все пациенты с БГ являлись компаундными гетерозиготами «легкой» (p.N370S) и одной из «тяжелых» мутаций. Макрофаги периферической крови культивировали без и в присутствии MLi-2 (Abcam). Активность лизосомных гидролаз (GCase, альфа-галактозидаза (GLA), кислая сфингомиелиназа (ASMase), галактозилцереброзидазы (GALC)) и концентрацию сфинголипидов (глоботриаозилсфингозин (LysoGb3), сфингомиелин (LysoSM), гексозилсфингозин (HexSph)) оценивали в трех повторах методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты

Первичная культура макрофагов пациентов с БГ и GBA1-БП характеризовалась снижением активности GCase и увеличением концентрации HexSph по сравнению с контролем (p < 0,05). Среди пациентов с GBA1-БП наиболее выраженное снижение активности GCase и повышение концентрации HexSph выявлено у носителей «тяжелой» мутации p.L444P по сравнению с носителями «легкой» мутации p.N370S.

Впервые показано, что первичная культура макрофагов пациентов с БГ характеризовалась также снижением концентрации LysoSM по сравнению с контролем (p < 0,05). Ингибирование LRRK2 не влияло на активность GCase и других лизосомных гидролаз в макрофагах пациентов с БГ, но приводило к увеличению концентрации LysoSM. В свою очередь, культивирование макрофагов пациентов с GBA1-БП в присутствии ингибитора LRRK2 приводило к увеличению активности не только GCase (p < 0,05), но и других гидролаз — GLA и ASMase (p > 0,05). Стоит отметить, что выявленный эффект был более выражен для пациентов с «тяжелой» мутацией p.L444P.

Выводы

Ингибирование LRRK2 не влияло на активность исследуемых гидролаз в макрофагах пациентов с БГ, вероятно, из-за отсутствия функциональной копии гена *GBA1*, но влияло на концентрацию LysoSM.

В то же время ингибирование киназной активности LRRK2 оказывает влияние на активность лизосомных ферментов (GCase, GLA, ASMase) у пациентов с GBA1-БП. Данный эффект преимущественно наблюдается при наличии «тяжелых» мутаций, таких как p.L444P, которая локализована вне каталитического центра фермента. Предполагается, что усиление транспорта посредством ингибирования LRRK2 способствует доставке нестабильного, но потенциально активного фермента в лизосомы, что приводит к частичному восстановлению активности GCase, а также активации других лизосомных гидролаз в макрофагах пациентов.

Полученные данные подтверждают перспективность ингибирования LRRK2 как таргетной терапии GBA1-БП, при этом эффективность такого подхода может зависеть от типа мутации в гене *GBA1* и особенностей лизосомного метаболизма.

Литература

1. Ysselstein D. et al. LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients // Nat. Commun. 2019. Vol. 10 (1). P. 5570.

2. Усенко Т. С. и др. Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона // Медицинская генетика. 2022. Т. 21 (12). С. 26–29.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-309

УРОВЕНЬ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ МИКРОРНК В ЭКЗОСОМАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТЕОГЕННЫМИ САРКОМАМИ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПИИ

THE LEVEL OF TUMOR-ASSOCIATED MICRORNAS IN THE BLOOD EXOSOMES OF PATIENTS WITH OSTEOGENIC SARCOMAS BEFORE AND AFTER THERAPY

А. А. Борисова[1], П. К. Ситников[2], С. Н. Тамкович[1]

[1] *Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск*
[2] *Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН*

A. A. Borisova[1], P. K. Sitnikov[2], S. N. Tamkovich[1]

[1] *E. N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk*
[2] *Tomsk National Research Medical Center RAS*

✉ a.borisova5@g.nsu.ru

Аннотация

Проведено сравнение уровней потенциальных онкомаркеров miR-92a и miR-101 в экзосомах больных остеогенными саркомами до и после терапии. Выявлены изменения относительных уровней данных микроРНК в экзосомах больных в ответ на терапию.

Abstract

The levels of potential cancer markers miR-92a and miR-101 in exosomes of patients with osteogenic sarcomas before and after therapy were compared. Changes in the relative levels of these microRNAs in patients' exosomes in response to therapy were revealed.

Остеогенные саркомы характеризуются относительно низкой заболеваемостью, но при этом высокой смертностью вследствие агрессивного течения болезни [1]. Для больных со злокачественными новообразованиями костей классическая биопсия осложнена труднодоступностью биоматериала, а также травматичностью процедуры. Преимуществами жидкостной биопсии являются низкая инвазивность, возможность неоднократного проведения процедуры, а также получения полного молекулярного портрета гетерогенной опухоли. Таким образом, поиск онкомаркеров для жидкостной биопсии при остеогенных саркомах является актуальной задачей. Перспективным источником данных маркеров являются экзосомы благодаря устойчивости переносимых молекул к гидролизу [2].

Известно, что miR-92a является канцерогенез-стимулирующей [3], а miR-101 — канцерогенез-супрессирующей [4]. При этом повышен уровень miR-92a [3] и понижен уровень miR-101 при ЗНО [5], что позволяет рассматривать данные микроРНК в качестве перспективных онкомаркеров для жидкостной биопсии.

Целью данного исследования является оценка экзосомальных miR-92a и miR-101 в качестве потенциальных маркеров для мониторинга эффективности терапии пациентов с остеогенными саркомами.

Материалы и методы

В данном исследовании проанализировано 12 образцов экзосом крови от девяти пациентов, больных хондро- и остеосаркомами, и 14 образцов здоровых доноров. Кровь пациентов получали перед терапией и через девять месяцев после терапии. Образцы экзосом были выделены из крови ультрафильтрацией с последующим ультрацентрифугированием и охарактеризованы методами трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Относительный уровень выделенных из экзосом микроРНК определяли обратной транскрипцией с ПЦР в режиме реального времени. Полученные данные нормировали на уровень miR-16 и объем крови. Достоверность различий между группами оценивали с помощью U-критерия Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при значениях $p \leqslant 0{,}05$.

Результаты

Сравнение относительных уровней опухоль-ассоциированных микроРНК в составе экзосом крови выявило статистически значимое повышение уровня канцерогенез-стимулирующей miR-92a у первичных больных с остеогенными саркомами, при этом наблюдается тенденция к уменьшению уровня данной микроРНК у боль-

© А. А. Борисова, П. К. Ситников, С. Н. Тамкович, 2025

ных, прошедших терапию. Выявлена тенденция к повышению уровня опухоль-супрессорной miR-101 в экзосомах плазмы крови у прошедших лечение пациентов.

Заключение

Полученные результаты указывают на потенциальную возможность использования miR-92a и miR-101 в составе экзосом крови в качестве онкомаркеров для оценки эффективности терапии пациентов с остеогенными саркомами.

Литература

1. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Злокачественные новообразования в 2023 году в России (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024.

2. Agnoletto C., Pignochino Y., Caruso C., Garofalo C. Exosome-based liquid biopsy approaches in bone and soft tissue sarcomas: review of the literature, prospectives, and hopes for clinical application // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, No. 6. P. 5159.

3. Fang L., Wang X., Sun B. et al. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells // International Journal of Molecular Medicine. 2017. Vol. 40, No. 6. P. 1624–1630.

4. Liu N., Yang C., Gao A., Sun M., Lv D. MiR-101: an important regulator of gene expression and tumor ecosystem // Cancers. 2022. Vol. 14, No. 23. P. 5861.

5. Yao Z., Li C., Liang D. et al. Diagnostic and prognostic implications of serum miR-101 in osteosarcoma // Cancer Biomarkers. 2018. Vol. 22, No. 1. P. 127–133.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-310

ПОТЕНЦИАЛ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ КАК ИНСТРУМЕНТА ГЕННОЙ ТЕРАПИИ СТРИКТУР ПИЩЕВОДА *

POTENTIAL OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES AS A TOOL FOR GENE THERAPY OF ESOPHAGEAL STRICTURES

М. А. Водопетова, В. С. Глазьева, А. В. Раднаева, Н. А. Александрушкина, П. И. Макаревич

Центр регенеративной медицины МНОИ МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

M. A. Vodopetova, V. S. Glazieva, A. V. Radnaeva, N. A. Alexandrushkina, P. I. Makarevich

Center for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University

✉ glazievavalentina@mail.ru

Аннотация

Исследование направлено на оценку перспективности аденоассоциированных вирусов (ААВ) для трансдукции стромальных клеток пищевода с целью профилактики послеоперационных стриктур. Проведена оценка эффективности различных серотипов ААВ в трансдукции первичной культуры стромальных клеток пищевода крысы и выявлена максимальная эффективность серотипа AAV6. Отработана методика интрамурального введения ААВ в стенку пищевода для исследований *in vivo*.

Abstract

This study aims to assess the feasibility of utilizing adeno-associated viruses (AAVs) for transducing esophageal stromal cells to prevent esophageal stricture formation. The transduction efficiency of various AAV serotypes was evaluated in a rat esophageal stromal cell culture model with AAV6 maximal transduction efficiency. A methodology for the intramural delivery of AAV vectors into the esophageal wall was established for subsequent in vivo investigation.

У человека в основе восстановления большинства тканей после повреждения лежит фибропролиферативное перерождение тканей, при котором специализированные клетки пораженного органа замещаются соединительнотканными элементами. Это может приводить к прогрессирующему фиброзу, необратимой утрате физиологических функций и в итоге вызывать жизнеугрожающую органную недостаточность. В этом свете особую актуальность приобретает проблема фиброзной трансформации и рубцовых изменений полых органов, где они вызывают нарушение проходимости за счет формирования стеноза.

В частности, послеоперационные стриктуры пищевода, формирующиеся как следствие фиброзных изменений в зоне повреждения, часто возникают после радикальных хирургических вмешательств (таких как эзофагэктомия или резекция слизистой оболочки) либо в результате химических поражений. Современные подходы к лечению носят преимущественно симптоматический характер и включают баллонную дилатацию, стентирование или повторные оперативные вмешательства, ни один из которых не гарантирует стойкого клинического эффекта.

В данном контексте особое значение приобретает разработка патогенетически обоснованных методов предотвращения фиброзных изменений, и генная терапия может рассматриваться как одно из наиболее перспективных направлений. Важно отметить, что такой подход обладает двойным потенциалом: с одной стороны, он углубляет фундаментальные представления о молекулярных основах фиброгенеза, с другой — выявляет новые молекулярные мишени для терапевтического вмешательства.

Целью нашего исследования стала оценка перспективности аденоассоциированных вирусов (ААВ) как инструмента для трансдукции стромальных клеток пищевода для создания подходов к генной терапии и профилактике стриктур. В настоящее время ААВ являются одной из наиболее эффективных платформ для доставки генетического материала, что подтверждается успешной трансдукцией различных типов тканей. Хотя известны методы доставки ААВ в стенку кишечника, исследования по пищеводу ограничены, особенно в отношении трансдукции стромальных клеток.

Нами была успешно выделена первичная культура стромальных клеток пищевода крысы, после чего проведена их трансдукция *in vitro* различными серотипами аденоассоциированного вируса (ААВ6, ААВ8, ААВ9), несущего ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Проведенный сравнительный анализ трансдукционной эф-

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2025-487).

© М. А. Водопетова, В. С. Глазьева, А. В. Раднаева, Н. А. Александрушкина, П. И. Макаревич, 2025

фективности выявил наиболее перспективный серотип вируса — AAB6, показавший успешную доставку и экспрессию GFP в культуре. Также нами было отработано интрамуральное введение AAB в стенку пищевода животным для дальнейшего исследования трансдукции *in vivo*.

В дальнейшем планируется оценка функциональной активности трансдуцированных клеток как в норме, так и в условиях моделируемой патологии. Полученные результаты могут лечь в основу новых подходов к исследованию патогенеза стриктур полых органов и разработке терапии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-311

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДБОР БАКТЕРИОФАГОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ИСМП У ПАЦИЕНТОВ С ОГНЕСТРЕЛЬНЫМИ И ОЖОГОВЫМИ РАНЕНИЯМИ

PERSONALIZED BACTERIOPHAGE SELECTION IN COMPLEX THERAPY OF HAI IN PATIENTS WITH GUNSHOT AND BURN WOUNDS

А. М. Воробьев[1], Е. С. Зубкова[1], Е. В. Морозова[1], И. А. Киселева[1], М. А. Пасивкина[1], А. А. Воробьева[1], О. Г. Ефимова[1], П. С. Маркевич[2], Н. Д. Долинер[3], Е. В. Тиванова[4], А. В. Алехнович[5,6], А. В. Алешкин[7], А. В. Тутельян[4], В. Г. Акимкин[4]

[1]Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского
[2]Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий им. А. А. Вишневского, Красногорск
[3]Главный военный клинический госпиталь им. Н. Н. Бурденко, Москва
[4]Центральный НИИ эпидемиологии, Москва
[5]Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва
[6]Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва
[7]ООО «Орфан-Био», Москва

A. M. Vorobev[1], E. S. Zubkova[1], E. V. Morozova[1], I. A. Kiseleva[1], M. A. Pasivkina[1], A. A. Vorobeva[1], O. G. Efimova[1], P. S. Markevich[2], N. D. Doliner[3], E. V. Tivanova[4], A. V. Alekhnovich[5,6], A. V. Aleshkin[7], A. V. Tutelian[4], V. G. Akimkin[4]

[1]G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology
[2]National Medical Research Center of High Medical Technologies named after A. A. Vishnevsky, Krasnogorsk
[3]Main Military Clinical Hospital named after N. N. Burdenko, Moscow
[4]Central Research Institute for Epidemiology, Moscow
[5]Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow
[6]Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow
[7]Orphan-Bio LLC, Moscow

✉ vorobiev@gabrich.ru

Аннотация

Риск ИСМП значительно возрастает у пациентов с огнестрельными и ожоговыми ранениями, полученными в ходе военных конфликтов (в том числе СВО) ввиду специфики эвакуации и транспортировки раненых. Применение нового алгоритма персонализированной фаготерапии в комбинации с антибиотиками позволяет эффективно бороться с ИСМП у данной категории пациентов и достичь благоприятного исхода в 81 % случаев.

Abstract

The risk of HAI increases significantly in patients with gunshot and burn wounds received during military conflicts (including SMO) due to the specifics of evacuation and transportation of the wounded. The use of a new algorithm of personalized phage therapy in combination with antibiotics allows us to effectively combat HAI in this category of patients and achieve a favorable outcome in 81 % of cases.

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), остаются значимой проблемой как в РФ, так и за рубежом [1–3]. В условиях СВО рост ИСМП, вызванных поли- и панрезистентными штаммами ESKAPE-патогенов, существенно превышает показатели гражданских ЛПУ, что объясняется большим числом этапов эвакуации раненых с поля боя и длительным временем, необходимым для их транспортировки до профильного медицинского учреждения. Данная проблема требует комплексного подхода к терапии пациентов с огнестрельными и ожоговыми ранениями, в том числе с применением персонализированной фаготерапии, которая в комбинации со стандартной рациональной антибактериальной химиотерапией может значительно улучшить прогноз для описанной категории пациентов.

В рамках взаимодействия Роспотребнадзора, ФГБУ «НМИЦ ВМТ — ЦВКГ им. А. А. Вишневского» и ФГБУ «ГВКГ им. Н. Н. Бурденко» был апробирован алгоритм персонализированного подбора бактериофа-

© А. М. Воробьев, Е. С. Зубкова, Е. В. Морозова, И. А. Киселева, М. А. Пасивкина, А. А. Воробьева, О. Г. Ефимова, П. С. Маркевич, Н. Д. Долинер, Е. В. Тиванова, А. В. Алехнович, А. В. Алешкин, А. В. Тутельян, В. Г. Акимкин, 2025

гов для их применения в составе комбинированной антибактериальной терапии и значительно сокращающий время от получения бактериального изолята до назначения препарата бактериофага по сравнению с уже существующей концепцией фаготерапии [4]. Алгоритм заключался в подборе коммерческих препаратов бактериофагов с подтверждением вирулентности бактериофага, активного в отношении возбудителя, методом ПЦР. Применение коммерческих препаратов позволило исключить стадии, связанные с производством, очисткой и оценкой безопасности бактериофагов, и передавать пациентам активный препарат уже через 3 дня после получения изолята.

В исследование были включены 279 пациентов, от которых было получено 522 пробы и выделено 427 полирезистентных штаммов-возбудителей ИСМП из группы ESKAPE, среди которых доминирующими оказались *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* (70 % от всех выделенных возбудителей). При этом только у 31,3 % пациентов наблюдалась моноинфекция, в остальных случаях из биоматериала выделялось два и более возбудителей.

Для персонализированной фаготерапии использовались препараты АО НПО «Микроген», чувствительность к которым определялась *in vitro* методом спот-теста (определение чувствительности штамма-возбудителя к бактериофагу) и модифицированным методом Грациа (подтверждение репликации бактериофага на штамме-возбудителе) с последующим подтверждением вирулентности активного бактериофага методом ПЦР.

Разработанный алгоритм позволил подобрать активный препарат бактериофага в 61,12 % случаев. У 81 % пациентов, которым были подобраны препараты бактериофагов, удалось достичь полной санации или значительного снижения титра возбудителя и обеспечить более благоприятный исход по основному заболеванию.

Таким образом, персонализированная фаготерапия может служить эффективным дополнением к стандартным методам лечения и позволяет эффективно бороться с резистентными микроорганизмами. При этом использование коммерческих препаратов бактериофагов позволяет значительно сократить время, необходимое для подбора активного препарата, и оперативно назначить пациенту соответствующее лечение.

Литература

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. P. 1–257.

2. Митяева М. А., Уогинтас А. А., Дороганова В. В. и др. Антибиотикорезистентность: анализ проблемы и возможные пути ее решения // Современные аспекты медицины и фармации: материалы конференции. Кемерово, 2023. С. 232–241.

3. Сериков П. В., Слепухина А. В. Бесконтрольный прием антибактериальных препаратов как актуальная проблема современной медицины // Наука через призму времени. 2020. Т. 6, № 39. С. 62–64.

4. Алешкин А. В., Селькова Е. П., Ершова О. Н. и др. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи // Фундаментальная и клиническая медицина. 2018. Т. 3, № 2. С. 66–74

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-312

ОЦЕНКА СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ГЕМОСТАЗА И МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ В РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЛАБОРАТОРИИ «БИОБАНК ЮГРЫ»*

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF GENETIC FACTORS OF HEMOSTASIS AND FOLATE METABOLISM IN THE DEVELOPMENT OF PREGNANCY COMPLICATIONS USING THE "BIOBANK OF UGRA" LABORATORY'S BIORESOURCE COLLECTION

А. Х. Гапурова, А. В. Морозкина, М. Ю. Донников

Сургутский государственный университет

A. Kh. Gapurova, A. V. Morozkina, M. Yu. Donnikov

Surgut State University

✉ gapurova_akh@surgu.ru

Аннотация

В рамках настоящего исследования определена распространенность однонуклеотидных полиморфизмов в 12 генах, контролирующих систему гемостаза и метаболизм фолатов, на основе биоматериала, взятого у женщин репродуктивного возраста, проживающих в ХМАО-Югре. Построена четырехлокусная модель синергизма исследуемых однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с риском развития акушерских патологий.

Abstract

This study determined the prevalence of single–nucleotide polymorphisms in 12 genes that control the hemostasis system and folate metabolism, based on biomaterial obtained from women of reproductive age living in the Khanty-Mansi Autonomous Okrug — Yugra. A four-locus model of the synergism of the studied single-nucleotide polymorphisms associated with the risk of developing obstetric pathologies was constructed.

В последние годы накоплено значительное количество данных, подтверждающих влияние наследственных факторов на развитие патологий беременности. При этом ключевую роль в понимании патогенеза гестационных осложнений играет исследование полиморфных генов, связанных с системой гемостаза и обменом фолатов. Данная область знаний становится особенно важной в рамках предиктивной медицины, для реализации которой в современной медицине требуется развитие передовых биомедицинских технологий и проведение генетических исследований. Данные задачи требуют анализа значительных объемов данных. В этом контексте современные биобанки стали незаменимой структурой, обеспечивающей накопление, хранение и использование биологических образцов и сопутствующей информации в количествах, необходимых для проведения генетических исследований.

На основе собранной в биобанке Югры биоресурсной коллекции «Патология беременности» и базы данных с клинической информацией был выполнен анализ образцов крови, собранных у 248 женщин, проходивших наблюдение в БУ ХМАО-Югры Сургутской городской клинической поликлинике № 1 и Сургутском окружном клиническом центре охраны материнства и детства. Основная группа состояла из 129 женщин с различными плацентарными нарушениями, включая случаи преждевременного разрыва плодных оболочек, преждевременных родов, преэклампсии и задержки развития плода. Контрольная группа включала 119 условно здоровых беременных женщин. Генотипирование проводилось по 12 полиморфным локусам: *F2* — rs1799963, *F5* — rs6025, *F7* — rs6046, *F13* — rs5985, *FGB* — rs1800790, *ITGA2* — rs1126643, *ITGB3* — rs5918, *SERPINE1* — rs1799768, *MTHFR* — rs1801133, *MTHFR* — rs1801131, *MTR* — rs1805087, *MTRR* — rs1801394.

При проведении сравнительного анализа частот аллелей генов, участвующих в гемостазе и метаболизме фолатов у женщин с акушерскими осложнениями и у здоровых женщин, статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). Тем не менее следует отметить тенденцию к повышению частоты аллеля 4G/4G гена *SERPINE1*, отвечающего за подавление фибринолиза, у женщин с осложнениями беременности (30,23 против 21,01 % в контрольной группе). В то же время среди здоровых женщин наблюдается повышенная, хотя и статистически незначимая ($p = 0,052$), частота нормального аллельного варианта C/C гена *ITGA2*, участвующего

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-574-05.

© А. Х. Гапурова, А. В. Морозкина, М. Ю. Донников, 2025

в образовании рецепторов коллагена на мембране тромбоцитов. В контрольной группе также чаще встречается полиморфный вариант гена *F13*, который, по мнению некоторых исследователей, может обладать защитным эффектом в отношении тромбофилии и снижать риск осложнений беременности. Полиморфизм гена метионин-синтазы-редуктазы *MTRR* — 66A/G, участвующей в большом количестве биохимических реакций, связанных с переносом метильной группы, оказался самым распространенным в обеих когортах (79,07 % в основной и 78,99 % в контрольной группе).

Учитывая, что отдельные «неблагоприятные» аллельные варианты не вызывают развитие патологий сами по себе, а проявляют свой эффект только в сочетании друг с другом, был проведен анализ межгенных взаимодействий с помощью метода многофакторного уменьшения размерности. В результате анализа построена четырехлокусная модель синергизма исследуемых однонуклеотидных полиморфизмов *F13* (103G/T) + *SERPINE1* (–67555G/4G) + *MTHFR* (677C/T) + *MTHFR* (1298A/C), ассоциированных с риском развития больших акушерских синдромов. Расширение данной модели прогнозирования за счет включения более широкого спектра генетических вариантов, клинико-анамнестических данных и факторов окружающей среды обуславливает возможность оценки индивидуальной предрасположенности к акушерско-гинекологической патологии на любом этапе консультирования женщины.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-313

РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕДРЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ ФОКУСНОЙ ЭХОКАРДИОГРАФИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

RESULTS OF THE INTRODUCTION OF FOCAL ECHOCARDIOGRAPHY INTO CLINICAL PRACTICE IN NEWBORN CHILDREN

Е. С. Гладких, Н. Г. Попова

Читинская государственная медицинская академия

E. S. Gladkih, N. G. Popova

Chita State Medical Academy

✉ ekaterina.gladkikh96@yandex.ru

Аннотация

В исследовании проведена ретроспективная оценка внедрения функциональной эхокардиографии по клинико-анамнестическим данным 2 групп новорожденных с шоком. По результатам исследования получены данные о том, что введение функциональной эхокардиографии в практику диагностики шока уменьшает индекс инотропной поддержки и приводит к уменьшению летальности.

Abstract

The study conducted a retrospective assessment of the implementation of functional echocardiography based on clinical and anamnestic data of 2 groups of newborns with shock. The results of the study showed that the introduction of functional echocardiography into the practice of shock diagnosis reduces the index of inotropic support and leads to a decrease in mortality.

В соответствии с клиническими рекомендациями «Диагностика и лечение шока у новорожденных» 2019 г., которые в настоящее время пересматриваются, нет возможности индивидуального подбора вазоактивной инотропной терапии (ВИТ) при шоках различной этиологии. Для выявления патофизиологических механизмов нарушений гемодинамики при возникновении шока у новорожденных детей активно внедряется фокусная эхокардиография (ф-ЭхоКГ), которая позволяет скорректировать ВИТ и улучшить исход заболевания.

Цель исследования — оценить эффективность внедрения ф-ЭхоКГ в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) у новорожденных разных сроков гестации (СГ), реализовавших шок различной этиологии.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе ОРИТН ГБУЗ «Забайкальский краевой перинатальный центр» с января 2023 по декабрь 2024 г. Ретроспективно оценены данные анамнеза, клинической картины, диагностические данные младенцев. Оценка противошоковой терапии была проведена по индексу инотропной поддержки (ИИП). В 2023 г. в ОРИТН госпитализирован 321 пациент, из них реализовали шок различной этиологии 24 новорожденных (7,4 %) — 1-я группа. Лечение шока у детей 1-й группы проводилось согласно клиническим рекомендациям. В 2024 г. поступило на лечение 342 ребенка, а шок диагностирован у 15 младенцев (4,4 %) — 2-я группа. Выбор ВИТ у детей 2-й группы определялся по результатам ф-ЭхоКГ. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программ Statistica-6.0, Microsoft Excel 2010. Распределение в группах не соответствовало нормальному, поэтому описание проведено в виде Me [25–75], сравнение непараметрических показателей проводилось при помощи критерия Манна — Уитни и χ^2 с поправкой Йейтса. Различия значимы при $p < 0{,}05$.

Результаты

В обеих группах наблюдения преобладали недоношенные младенцы (в 1-й группе — 100 %, в 2-й группе — 73 %), доношенные дети выявлены в 2-й группе — 27 % (χ^2 7,13; $p = 0{,}007$). В обеих группах преобладали мальчики, 58 и 73 % соответственно, без значимой разницы (χ^2 0,9; $p = 0{,}94$). Медиана массы тела в 1-й группе составила 945 граммов [480–3740], в 2-й группе — 1900 граммов [680–3980]. Внутриутробный период был отягощен хронической урогенитальной инфекцией у 17 детей из 24 в 1-й группе (70,1 %), и у 12 из 15 (80 %) в 2-й группе ($p = 0{,}674$). Хроническая гипоксия диагностирована в 1-й группе с частотой 37,5 %, в 2-й — 20 % ($p = 0{,}258$). Тяжелая асфиксия при рождении отмечалась у 45 % новорожденных 1-й группы и у 16 % 2-й груп-

© Е. С. Гладких, Н. Г. Попова, 2025

пы, умеренная асфиксия диагностирована у 41 % детей 1-й группы против 40 % в 2-й группе, без статистически значимых различий.

Основным диагнозом у младенцев в обеих группах был сепсис: 95 % в 1-й группе, 66 % — в 2-й группе. Внутрижелудочковое кровоизлияние III степени у 8 % в 1-й группе, у 6 % — в 2-й группе, постасфиксическая полиорганная недостаточность в 1-й группе у 20 %, в 2-й группе у 26 %, без значимой разницы (χ^2 0,24; p = 0,62). Этиология шока в группах сравнения значимо различалась. В 1-й группе в 96 % случаев диагностирован дистрибутивный шок, у 4 % кардиогенный, в 2-й группе — дистрибутивный выставлялся у 60 %, кардиогенный — 20 % и гиповолемический у 20 % (χ^2 8,05; p = 0,004). Сроки развития шока идентичны: в 1-й группе у 20 из 24 детей в 1-е сутки, у 1 ребенка — старше 3 суток, в 2-й группе у 11 из 15 детей (74 %) с первого дня рождения, у 26 % старше 3 суток жизни (χ^2 0,57; p = 0,45). При терапии шока рассчитан ИИП в 1-й группе Me 103 [40,5–159,5], в 2-й группе — 29 [17–87] (U-test p = 0,031).

Летальность в 1-й группе составила 19 из 24 (79 %), в 2-й группе умерло 7 из 15 (47 %), что значимо меньше (χ^2 4,39; p = 0,037).

Выводы

Введение ф-ЭхоКГ в практику диагностики патофизиологии шока уменьшает ИИП. Применение ф-ЭхоКГ приводит к уменьшению летальности.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-314

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МСК ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЦЕЛЯХ ПОДАВЛЕНИЯ ФИБРОЗА *

CLINICAL DEVELOPMENT OF MSC CELL SHEET TRANSPLANTATION TO INHIBIT FIBROSIS

В. С. Глазьева[1], М. А. Водопетова[1], А. В. Шершнева[2],
К. Г. Каргалинина[2], П. И. Макаревич[1], Н. А. Александрушкина[1]

[1] *Центр регенеративной медицины МНОИ МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва*

V. S. Glazieva[1], M. A. Vodopetova[1], A. V. Shershneva[2],
K. G. Kargalinina[2], P. I. Makarevich[2], N. A. Alexandrushkina[1]

[1] *Center for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University*
[2] *Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow*

✉ glazievavalentina@mail.ru

Аннотация

С использованием мезенхимных стромальных клеток (МСК) нами создана перспективная платформа для получения тканеинженерных конструкций (клеточных пластов). Стандартизация протоколов получения клеточных пластов — ключевой этап их клинического внедрения. Изучение механизмов организации тканеинженерных конструкций позволит оптимизировать производство клеточных продуктов и раскрыть принципы действия МСК в составе пластов.

Abstract

Using mesenchymal stromal cells (MSCs), we have developed a promising platform for generating tissue-engineered constructs (cell sheets). Standardization of cell sheet production protocols is a crucial step for their clinical implementation. Investigating the mechanisms underlying the organization of tissue-engineered constructs will enable optimization of cell product manufacturing and elucidate the mechanisms of action of MSCs within the cell sheets.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) в настоящее время рассматривают как наиболее перспективный источник для разработки биомедицинских клеточных продуктов. Высокий регенеративный потенциал МСК *in vivo* может быть реализован при условии сохранения ими жизнеспособности, а также при обеспечении целостности пространственных и физиологических взаимодействий, характерных для формирующейся или полноценной ткани. Одним из способов решения этих задач является технология клеточных пластов (КП), которые представляют собой самоорганизующиеся конструкции, состоящие из МСК и наработанного ими внеклеточного матрикса (ВКМ). Эффекты КП из МСК были успешны продемонстрированы нашей группой на моделях ишемизированной скелетной мышцы мыши, пролежневых дефектах и глубоких ранах кожи. В настоящее время активно изучается потенциал КП из МСК как перспективного клеточного продукта с антифибротическими свойствами на модели послеоперационных стриктур пищевода.

Ограничения, связанные со свойствами МСК и методами сборки из них КП, приводят к проблемам стандартизации протоколов получения готовых конструкций с заданными характеристиками в установленные сроки. В нашем исследовании был отработан протокол получения КП из МСК, а также проведена характеристика МСК, полученных из жировой ткани разных доноров. Было показано, что скорость сборки КП не зависит от пола и возраста донора. При анализе кривых роста клеточной культуры было обнаружено, что МСК с длительным временем лаг-фазы формируют КП в более длительные сроки. В то же время количественное содержание коллагена I и IV типа положительно коррелировало со сроками сборки КП. Данные характеристики МСК могут быть использованы для отбора клеточных линий на начальных этапах культивирования.

Помимо различий в скорости сборки КП из МСК, которая варьирует от донора к донору, существует проблема спонтанной контракции КП, которая ведет к потере конструктов. Нами было предположено, что процесс контракции КП может быть аналогичен процессу контракции соединительной ткани в ходе заживления и опосредован миофибробластами.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ им. М. В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

© В. С. Глазьева, М. А. Водопетова, А. В. Шершнева, К. Г. Каргалинина, П. И. Макаревич, Н. А. Александрушкина, 2025

При дифференцировке в миофибробласты клетки приобретают не только сократительный фенотип с повышенной экспрессией α-гладкомышечного актина (αГМА), но также увеличивают продукцию ВКМ, что может влиять на темпы контракции, которая наблюдается на финальных этапах сборки КП. Тем не менее нам не удалось установить зависимость скорости сборки КП от количественного и качественного содержания αГМА-положительных МСК. Однако нами также была установлена связь сроков сборки КП из МСК с содержанием активированных МСК промежуточного фенотипа, положительных по FAPα (белок активации фибробластов α), что указывать на идущие в составе конструкции процессы дифференцировки МСК.

Таким образом, комплексная задача по стандартизации протоколов сборки клеточных пластов из МСК для клинического применения позволит оптимизировать производство клеточных продуктов и уточнить принципы действия МСК в составе КП при повреждениях тканей различного генеза.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-315

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИКАЦИИ НЕЙЛОНА L-АРГИНИНОМ ДЛЯ ШВА НЕРВА *

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF L-ARGININE NYLON MODIFICATION FOR NERVE SUTURING

У. Е. Головачева, К. А. Пильщикова, А. М. Маковская

Ярославский государственный медицинский университет

U. E. Golovacheva, K. A. Pilshchikova, A. M. Makovskaya

Yaroslavl State Medical University

✉ tsiganovauliana@mail.ru

Аннотация

Изучены особенности восстановления нерва после повреждения в условиях наложения шва с адгезией L-аргинина на шовный материал. Крысам проводили операцию обычной и модифицированной нитью. Установлено, что адгезия L-аргинина на шовный материал приводит к сохранению большего количества АХЭ-позитивных волокон, а также уменьшает выраженность воспалительной реакции вокруг шовного материала в ранние сроки, приводя к сокращению зоны рубца в последующем.

Abstract

The features of nerve regeneration after damage under conditions of suture with L-arginine adhesion to the suture material were studied. The rats underwent surgery with a usual and modified thread. It is established that the adhesion of L-arginine to the suture material leads to the preservation of more AChE-positive fibers, and also reduces the severity of the inflammatory reaction around the suture material in the early stages, leading to a reduction in the scar zone in the future.

Для ускорения регенерации нерва после повреждения предлагается использование различных носителей, позволяющих доставить лекарственные препараты в зону шва [1]. С учетом того, что оксид азота является важным фактором как в воспалительных, так и в нейронных дегенеративных и регенеративных процессах, предложено адгезировать молекулы L-аргинина — донора оксида азота — на шовный материал.

Фермент ацетилхолинэстераза образуется в соме нейрона и транспортируется по аксону к пресинаптическим нервным окончаниям или к нейромышечным синапсам. Позитивная реакция на АХЭ является признаком сохранения синтетических и транспортных процессов в соме нейрона и его отростках. Позитивная реакция может проявляться только в осевых цилиндрах проводников и не зависит напрямую от состояния миелиновых оболочек. Негативная реакция на АХЭ свидетельствует о том, что в данном фрагменте нерва еще нет прорастающих волокон [2].

Цель работы — оценить влияние L-аргинина на регенерацию нерва крысы.

Задачи: на экспериментальной модели «шов нерва» оценить влияние адгезии L-аргинина на шовный материал на выраженность воспаления и жизнеспособность нерва.

Материалы и методы

Животные были разделены на 2 группы: контрольную (шов нейлоном 8/0) и экспериментальную (шов нейлоном 8/0 с адгезией L-аргинина) — по 9 крыс в каждой. Выполнялся микрохирургический шов седалищного нерва. Фрагмент нерва исследовался на 7, 14 и 28-е сутки после операции. Для оценки воспалительной реакции использовалась окраска гематоксилин-эозином, исследовались зоны инфильтрации/рубца вокруг шва. Также производилась гистохимическая окраска на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) для подсчета количества жизнеспособных аксонов в дистальном участке нерва [2]. Цифровые данные «Отношение количества АХЭ+-волокон на единицу площади (ед/мкм^2)» и «Площадь инфильтрации/пролиферации вокруг нити (мкм^2)» обрабатывали методами вариационной статистики в программе MS Excel 2010 путем подсчета среднеарифметического значения и его стандартного отклонения (M ± std). Статистическая значимость различий сравниваемых количественных признаков проводилась с помощью непараметрического U-теста Манна — Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

* Исследование выполнено за счет гранта «Гранты для молодых ученых медиков до 35 лет» ФГБОУ ВО «ЯГМУ» МЗ РФ.

© У. Е. Головачева, К. А. Пильщикова, А. М. Маковская, 2025

Результаты

На 7-е сутки исследования достоверных различий по количеству АХЭ+-волокон не наблюдалось (табл. 1). Зона инфильтрата в экспериментальной группе была достоверно меньше в 2 раза по сравнению с контрольной (табл. 2).

Таблица 1

Численная плотность АХЭ+-волокон, шт/1000 мкм^2

Срок после операции	Контрольная группа	Экспериментальная группа	*P**
7-е сутки	27,8 ± 1,45	25,3 ± 2,69	> 0,05
14-е сутки	13,6 ± 1,94*	20,9 ± 4,37*	0,001
28-е сутки	13,5 ± 0,93	19,6 ± 10,21	> 0,05

Таблица 2

Площадь инфильтрата/рубца вокруг шовного материала, мкм^2

Срок после операции	Контрольная группа	Экспериментальная группа	*P**
7-е сутки	25,2 ± 3,30*	12,9 ± 0,89*	0,001
14-е сутки	26,9 ± 2,83*	22,7 ± 1,09*	0,001
28-е сутки	21,1 ± 3,61	10,9 ± 2,35	> 0,05

На 14-е сутки количество аксонов в группе с модифицированным шовным материалом было в 5 раз больше по сравнению с контролем, различия достоверны. По сравнению с предыдущим сроком в обеих группах произошло их достоверное уменьшение. Можно сделать вывод о том, что к сроку 14 дней Валлеровская дегенерация уже произошла, и начинают образовываться новые аксоны. Быстрее она наблюдалась в контрольной группе. Зона инфильтрата в контрольной группе не значительно увеличилась, в экспериментальной группе она достоверно увеличилась в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком. Инфильтрат оставался большим в группе контроля.

К концу исследования (28-й день) количество АХЭ+-волокон в контрольной группе достоверно выросло в 3 раза по сравнению с предыдущим сроком. В экспериментальной группе показатель не изменился. Достоверно в экспериментальной группе количество жизнеспособных волокон было на 31 % больше. Рубцовая ткань была сформирована в обеих группах. В контрольной группе она уменьшилась на 22 % по сравнению с предыдущим сроком, а в экспериментальной — на 52 %, различия достоверны.

В целом рубец к концу исследования был меньше в 2 раза в экспериментальной группе по сравнению с контрольной. На всех сроках исследования наблюдалась слабая обратно пропорциональная взаимосвязь между площадью зоны инфильтрации и зоны пролиферации с количеством прорастающих волокон (коэффициент Пирсона равен −0,38).

Вывод

L-аргинин оказывает положительное влияние на прорастание нервных волокон при повреждении, действуя уже с 7-го дня наблюдения.

Литература

1. Цыганова У. Е., Лебедев П. В., Румянцева Т. А. Оценка эффективности модифицированных шовных материалов для микрохирургического шва нерва // Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии: мат-лы II Всерос. науч. конф. с междунар. уч. Ярославль: ЯГМУ, 2016. С. 64.

2. Патент № RU 2555750 Российская Федерация, МПК G01N 33/50 (2006.01). Способ интраоперационной оценки состояния периферических нервов: № 2013157128: заявл.: 23.12.2013: опубл. 10.07.2015 / Румянцева Т. А., Румянцева В. В., Новиков М. Л., Карапетян А. С.; заявитель ГБОУ ВО «Ярославская государственная медицинская академия» МЗ РФ. 5 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-316

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ МАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ

FEATURES OF THE METABOLIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES BEFORE AND AFTER MAGNETIC SEPARATION

Я. К. Грищук

Самарский государственный медицинский университет

I. K. Grishchuk

Samara State Medical University

✉ grischukyaroslav@ya.ru

Аннотация

Проведена сравнительная оценка метаболического профиля Т-лимфоцитов и исходной суспензии мононуклеарных клеток периферической крови доноров путем измерения скорости потребления кислорода под воздействием энергетических субстратов *in vitro*. Полученные данные подтвердили воспроизводимость метода, а также отсутствие необходимости дополнительной сепарации Т-лимфоцитов из суспензии мононуклеаров периферической крови.

Abstract

A comparative assessment of the metabolic profile of T-lymphocytes and the initial suspension of mononuclear cells from the peripheral donors' blood was carried out by measuring the rate of oxygen consumption under the influence of energy substrates *in vitro*. The data obtained confirmed the reproducibility of the method, as well as the absence of the need for additional separation of T-lymphocytes from the suspension of mononuclear cells from the peripheral blood.

Иммунная терапия — один из самых перспективных подходов к лечению онкологических и аутоиммунных заболеваний. В настоящее время идет интенсивный поиск новых иммунокорректоров и способов усиления специфических свойств иммунокомпетентных клеток, в первую очередь Т-лимфоцитов, для первичного скрининга которых необходимы простые и эффективные методы оценки реакции на воздействия *in vitro*. Одним из таких методов оценки процессов энергетического метаболизма лимфоцитов *in vitro* является измерение потребления кислорода клетками при внесении различных энергетических субстратов в присутствии и в отсутствие лекарственных препаратов [1, 2].

Целью исследования явилась сравнительная оценка метаболического профиля (изменение потребления кислорода под воздействием энергетических субстратов *in vitro*) Т-лимфоцитов, выделенных с помощью магнитной сепарации и суспензии мононуклеарных клеток периферической крови.

Лимфоциты (мононуклеарные клетки) выделяли из цельной крови десяти здоровых доноров, взятой в вакуумные пробирки с K_3ЭДТА, путем центрифугирования в градиенте фиколла плотностью 1,079 г/см^3 (ООО «Биолот», Россия). Т-лимфоциты из суспензии мононуклеарных клеток выделяли методом негативной сепарации с помощью набора Pan T Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec, США). Содержание популяций лимфоцитов до и после сепарации оценивали методом проточной цитофлюориметрии с помощью моноклональных антител CD45-FITC/CD16-PE+CD56-PE/CD3-ECD/CD19-PC5 на цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Клетки фиксировали в области рабочей зоны кислородного электрода Кларка, который помещали в кювету с рабочим раствором, поочередно добавляя растворы субстратов: D-глюкозы, сахарозы, мальтозы, лактозы, раффинозы, глицерина, пирувата натрия, цитрата натрия, глицерофосфата натрия, тартрата натрия, ацетата натрия, глицина, L-лизина гидрохлорида, L-аргинина гидрохлорида и L-орнитина гидрохлорида. Регистрацию и обработку сигналов осуществляли с использованием программного обеспечения Эксперт-00х (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия).

В качестве измеряемого параметра сигнала и условного показателя метаболической активности лимфоцитов использовали максимальную скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата (мг O_2/л с). Для удобства сравнения данных и нивелирования погрешностей, вызванных возможными различиями в количестве клеток и их метаболической активности у разных доноров, сигналы на субстраты в составе профиля приводили в процентах от сигнала на глицерофосфат натрия [3].

Анализ полученных данных показал, что при негативной магнитной сепарации Т-лимфоцитов чистота выделения клеток из суспензии мононуклеаров составляла 92–97 % при исходном относительном содержании

© Я. К. Грищук, 2025

63–74 %. При этом метаболический профиль клеток из суспензии мононуклеаров и обогащенной суспензии Т-лимфоцитов был сопоставим и характеризовался максимально выраженным положительным ответом в виде активного потребления кислорода на глицерофосфат натрия, усиленным потреблением кислорода в ответ на добавление лактозы и раффинозы, слабой реакцией на мальтозу и глицин, сильным подавлением кислородного метаболизма в ответ на добавление к среде цитрата натрия (см. таблицу).

Полученные данные подтверждают хорошую воспроизводимость метода измерения поглощения кислорода с помощью электрода Кларка при добавлении различных энергетических субстратов к лимфоцитам *in vitro*, а также об отсутствии необходимости специальной сепарации Т-лимфоцитов, поскольку основной вклад в потребление кислорода в суспензии мононуклеаров вносят преобладающие там Т-клетки.

Популяционный состав и особенности метаболического профиля сепарированных Т-лимфоцитов и мононуклеарных клеток периферической крови

Показатель	Суспензия мононуклеарных клеток, *n* = 10	Сепарированные Т-клетки, *n* = 10	Уровень статистической значимости отличий
Популяции лимфоцитов, %			
CD3+ (Т-лимфоциты)	68,5 ± 5,76	94,4 ± 2,7	$p < 0{,}001$
CD3-CD16+CD56+ (натуральные киллеры)	18,0 ± 2,1	3,5 ± 0,2	$p < 0{,}0001$
CD19+ (В-лимфоциты)	11,5 ± 1,9	2,3 ± 0,3	$p < 0{,}0001$
Максимальная скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата относительно реакции на глицерофосфат натрия, принятой за 100 %			
D-глюкоза	2,0 ± 0,3	2,5 ± 0,3	$p > 0{,}05$
Сахароза	11,5 ± 1,2	13,1 ± 1,4	$p > 0{,}05$
Мальтоза	2,8 ± 1,3	2,5 ± 0,4	$p > 0{,}05$
Лактоза	33,4 ± 2,3	29,1 ± 3,0	$p > 0{,}05$
Раффиноза	43,7 ± 4,1	49,5 ± 5,3	$p > 0{,}05$
Глицин	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	$p > 0{,}05$
Пируват натрия	10,2 ± 1,3	12,5 ± 1,1	$p > 0{,}05$
Цитрат натрия	−24,6 ± 2,3	−29,6 ± 3,8	$p > 0{,}05$

Литература

1. Ильясов П. В., Гусева О. С., Курицына А. П., Лимарева Л. В. Оценка физиолого-биохимических характеристик клеток на основе регистрации их респираторной активности при воздействии субстратов и токсических веществ // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 115–124.

2. Russo Eleonora et al. Energy Metabolism Analysis of Three Different Mesenchymal Stem Cell Populations of Umbilical Cord Under Normal and Pathologic Conditions // Stem cell reviews and reports. 2020. Vol. 16, No. 3. P. 585–595.

3. Ильясов П. В., Лимарева Л. В., Сизова А. И. и др. Оценка токсического действия 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазина по дыхательной активности лимфоцитов // Биологические мембраны. 2023. Т. 40, № 5. С. 342–350.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-317

СТРАТЕГИЯ УЛУЧШЕНИЯ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДИОСМИНА И ОЧИЩЕННЫХ МИКРОНИЗИРОВАННЫХ ФЛАВОНОИДНЫХ ФРАКЦИЙ В СОСТАВЕ АНГИОПРОТЕКТОРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ МЕТОДОМ ЭКСТРУЗИИ ГОРЯЧЕГО РАСПЛАВА

STRATEGY OF IMPROVING BIOPHARMACEUTICAL PROPERTIES OF DIOSMIN AND PURIFIED MICRONIZED FLAVONOID FRACTIONS IN ANGIOPROTECTIVE DRUGS BY HOT MELT EXTRUSION

А. А. Данилова, К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Е. В. Флисюк

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

A. A. Danilova, K. A. Gusev, D. N. Maimistov, E. V. Flisyuk

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

✉ shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

Аннотация

Методом экструзии горячего расплава получены образцы 100%-х аморфных твердых дисперсных систем диосмина и очищенных микронизированных флавоноидных фракций. Доказано улучшение биофармацевтических свойств образцов, что позволяет предложить их использование в качестве кандидатов для разработки ангиопротекторных лекарственных средств со сниженной терапевтической дозировкой.

Abstract

Samples of 100 % amorphous solid dispersion systems of diosmin and purified micronized flavonoid fractions were obtained via hot melt extrusion. The improved biopharmaceutical properties of solid dispersions have been demonstrated, enabling their proposal utilization as prospective candidates for the development of angioprotective drugs with reduced therapeutic dosages.

Активные фармацевтические субстанции (АФС) растительного происхождения — диосмин и его комбинация с гесперидином в соотношении 9 : 1 (очищенные микронизированные флавоноидные фракции, ОМФФ) входят в перечень основных компонентов для терапии хронических заболеваний вен. Однако их неудовлетворительные биофармацевтические свойства (крайне низкая растворимость в биорелевантных средах, ограниченная биодоступность) становятся причиной поиска рациональных решений увеличения растворимости АФС. На сегодняшний день промышленно адаптированным подходом является микронизация субстанций наряду с увеличением терапевтической дозировки вплоть до 1000 мг. Данная стратегия приводит к закономерному увеличению массы готовой лекарственной формы (ЛФ), что снижает комплаентность со стороны пациентов, а также усложняет реализацию процесса производства таблеток.

В качестве альтернативы существующим подходам нами предложена технология создания твердых дисперсных систем (ТДС) методом экструзии горячего расплава (ЭГР), которая позволяет нивелировать одновременно проблемы неудовлетворительных биофармацевтических свойств рассматриваемых субстанций и ограничения, связанные с промышленной реализацией технологического процесса [1].

Для создания ТДС диосмина и ОМФФ выбрана полимерная матрица в виде сополимера поливинилпирролидона с винилацетатом 60 : 40 (ПВПВА) — VIVAPHARM® PVP/VA 64 (*JRS Pharma*, Германия). Модельное соотношение компонентов с ТДС составило 1 : 99, на основании данных предыдущих исследований [2].

С учетом термических характеристик АФС диосмина и ОМФФ (температура плавления 285 °C), а также ПВПВА (температура стеклования 105 °C) подобран диапазон экструзионной обработки: в пределах 170–180 °C. На основании этого предложен интервал скоростей вращения шнеков — 20–35 об/мин, обеспечивающий надлежащее время пребывания АФС и носителя без термической деградации в матрице экструдера.

В результате получены ТДС диосмина и ОМФФ в виде светло-желтых полупрозрачных филаментов. Образцы характеризовались одним тепловым эффектом в области стеклования полимера-носителя, что свидетельствует об образовании гомогенной системы (потенциальном растворении АФС в матрице полимера-носителя) и косвенно указывает на аморфизацию действующего вещества. При исследовании структурных характеристик обнаружено сглаживание характеристических пиков кристаллических субстанций как следствие образования во-

© А. А. Данилова, К. А. Гусев, Д. Н. Маймистов, Е. В. Флисюк, 2025

дородных связей между полярными группами компонентов ТДС. Новые пики в спектре поглощения образцов не идентифицированы, то есть в ходе процесса ЭГР не происходило изменений химической структуры АФС наряду с сохранением фармакологической активности. За счет эффективного сплавления компонентов достигнуто увеличение водной растворимости АФС в составе твердых дисперсий более чем в 300 раз по сравнению с чистыми веществами. Рентгеноструктурные исследования подтвердили образование 100%-х аморфных ТДС диосмина и ОМФФ, сохраняющих физико-химическую стабильность в течение 6 месяцев в условиях исследования ускоренной стабильности.

Таким образом, предложенная стратегия улучшения биофармацевтических свойств АФС диосмина и ОМФФ демонстрирует потенциал в отношении разработки модифицированного полупродукта с целью дальнейшего создания твердой ЛФ с уменьшенной терапевтической дозировкой.

Литература

1. Patil H., Vemula S. K., Narala S. et al. Hot-melt extrusion: from theory to application in pharmaceutical formulation — where are we now? // AAPS PharmSciTech. 2024. Vol. 25 (2). P. 37.

2. Danilova A. A., Gusev K. A., Maimistov D. N. et al. Hot Melt Extrusion Technology as a Modern Strategy for Improving the Bioavailability of Flavonoids // Pharmaceutical Chemistry Journal. Vol. 58 (2). P. 297–305.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-318

МИРНК-НАПРАВЛЕННЫЕ МЕЗИЛЬНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ПРЕОДОЛЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ: АДДИТИВНЫЙ ЭФФЕКТ С ЦИСПЛАТИНОМ И ДОКСОРУБИЦИНОМ *

MIRNA-TARGETING MESYL OLIGONUCLEOTIDES AS TOOLS TO OVERCOME MULTIDRUG RESISTANCE: ADDITIVE EFFECTS WITH CISPLATIN AND DOXORUBICIN

Р. Демирел[1], С. К. Мирошниченко[1], Д. А. Стеценко[2], М. А. Маслов[3], М. А. Зенкова[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[3] *МИРЭА — Российский технологический университет, Москва*

R. Demirel[1], S. K. Miroshnichenko[1], D. A. Stetsenko[2], M. A. Maslov[3], M. A. Zenkova[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*
[3] *MIREA — Russian Technological University, Moscow*

✉ r.demirel@g.nsu.ru

Аннотация

В данной работе впервые проведено исследование эффектов совместного применения препаратов стандартной химиотерапии и миРНК-направленных мезильных антисмысловых олигонуклеотидов. Выявлено, что наиболее эффективные сочетания обеспечивают аддитивное подавление выживаемости опухолевых клеток с фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) за счет миРНК-опосредованного снижения экспрессии МЛУ-ассоциированных генов.

Abstract

This study represents the premier investigation of the effects of concurrent treatment with standard chemotherapy agents and miRNA-targeted mesyl antisense oligonucleotides. We demonstrate that the most effective combinations provide additive suppression of multidrug-resistant (MDR) cancer cell viability through miRNA-mediated downregulation of key MDR-associated genes.

Химиотерапия остается золотым стандартом в лечении злокачественных новообразований, однако ее эффективность существенно ограничена развитием фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток. Одну из важнейших ролей в формировании МЛУ играют микроРНК (миРНК) — короткие некодирующие молекулы РНК, которые являются тонкими регуляторами клеточного гомеостаза и модулируют экспрессию генов, ассоциированных с устойчивостью к химиотерапии. В связи с этим перспективным направлением в преодолении МЛУ является сочетанное применение химиопрепаратов, рекомендованных к использованию в клинике, и миРНК-направленных олигонуклеотидных агентов, способных «сенсибилизировать» опухолевые клетки к цитостатикам.

В данной работе впервые проведено исследование эффектов совместного применения препаратов первой и второй линии терапии (цисплатина и доксорубицина) и миРНК-направленных антисмысловых олигонуклеотидов с N(-метансульфонил)фосфорамидной модификацией межнуклеотидных связей (μ-АСО), ранее разработанных в ИХБФМ СО РАН. Данные μ-АСО являются одними из наиболее эффективных, специфичных и малотоксичных аналогов среди всех разработанных миРНК-направленных олигонуклеотидов в мире. Мишенями μ-АСО выступают высокоонкогенные миРНК-17, миРНК-21 и миРНК-155, играющие важную роль в формировании фенотипа МЛУ.

В рамках работы на линии клеток эпидермоидной карциномы КВ-8-5, обладающей фенотипом МЛУ, определены оптимальные схемы сочетанного применения препаратов: одновременная обработка опухолевых клеток μ-АСО и доксорубицином и предварительная трансфекция μ-АСО за 24 ч до введения цисплатина. Наибольшую эффективность продемонстрировали сочетания μ-21 и μ-17 с обоими цитостатиками. Выявлено, что совместное применение μ-21/μ-17 с доксорубицином обеспечивает в 2,2 раза более эффективное подавление выживаемости клеток КВ-8-5 по сравнению с использованием доксорубицина по отдельности. В случае комбинаций с цисплa-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-24-20029).
© Р. Демирел, С. К. Мирошниченко, Д. А. Стеценко, М. А. Маслов, М. А. Зенкова, 2025

тином, эффект сочетанного антипролеративного эффекта выше в 3,5 раза по сравнению с действием только цисплатина.

Исследование механизма совместного действия препаратов (синергия, аддитивное действие или антагонизм) показало, что соединения действуют аддитивно, причем максимальное ингибирование выживаемости клеток КВ-8-5 составляет 67–75 %. Важно отметить, что при совместном применении μ-21 и цитостатика ингибирующий эффект достигается при концентрации олигонуклеотида и цитостатика в 4 и 5 раз ниже соответственно, чем при их отдельном использовании. Тогда как в случае применения μ-17 совместно с доксорубицином или цисплатином максимальное, 75%-е, подавление выживаемости опухолевых клеток наблюдается при концентрациях олигонуклеотида и препарата в 10 раз ниже по сравнению с их применением по отдельности.

Установлен возможный молекулярный механизм совместного действия μ-АСО и цитостатиков. Усиленный эффект сочетанного эффекта препаратов на клетки КВ-8-5 обеспечивается снижением экспрессии МЛУ-ассоциированных генов *ABCB1*, *TUB4A*, *SEH1L* и *ZYX*. При этом наиболее важную роль в реализации аддитивного механизма действия играет вызываемое μ-АСО высокоэффективное, на 60 %, снижение экспрессии гена *ABCB1*, кодирующего Р-гликопротеин, который осуществляет эффлюкс цитостатиков.

Впервые показано, что комбинации μ-АСО и химиопрепаратов цисплатина и доксорубицина обеспечивают аддитивное подавление жизнеспособности опухолевых клеток с фенотипом МЛУ за счет миРНК-опосредованной регуляции генов, ассоциированных с формированием резистентности к химиотерапии. Полученные данные открывают новые возможности для терапии трудноизлечимых, высокоагрессивных форм злокачественных новообразований с резистентностью к химиотерапии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-319

ПРИМЕНЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА С ДОКАЗАННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ, КАК СПОСОБ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫХ С ОЖИРЕНИЕМ

THE USE OF HERBAL COMPOSITION CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH PROVEN EFFECTIVENESS AS A WAY TO CORRECT METABOLIC DISORDERS ASSOCIATED WITH OBESITY

И. Ю. Деулин, А. В. Троицкий, С. В. Янковская, В. Г. Селятицкая, М. И. Воевода

Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

I. Y. Deulin, A. V. Troitsky, S. V. Yankovskaya, V. G. Selyatitskaya, M. I. Voevoda

Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk

✉ svetlanaiankovskaia@gmail.com

Аннотация

Разработанная фитокомпозиция «Бергамот 350» сочетает стандартизированные экстракты бергамота (*C. bergamia*), диоскореи (*D. villosa*), барбариса (*B. vulgaris*) и маки перуанской (*L. meyenii*), демонстрирует эффективность в коррекции метаболических расстройств, связанных с ожирением. Высокий профиль безопасности делает композицию перспективной основой для разработки новых лекарственных средств, нацеленных на снижение кардиометаболических рисков.

Abstract

The developed phytocomposition “Bergamot 350” combines standardized extracts of bergamot (*C. bergamia*), dioscorea (*D. villosa*), barberry (*B. vulgaris*) and Peruvian maca (*L. meyenii*), demonstrates effectiveness in correcting metabolic disorders associated with obesity. The high safety profile makes the composition a promising basis for the development of new drugs aimed at reducing cardiometabolic risks.

В настоящее время проблема коррекции метаболических нарушений, ассоциированных с ожирением (инсулинорезистентность, нарушения углеводного обмена, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени), с целью профилактики сердечно-сосудистых осложнений приобретает особую значимость в связи с ограничениями традиционной фармакотерапии. Согласно данным ВОЗ (2023), более 1,9 млрд взрослых людей во всем мире имеют избыточную массу тела, из них 650 млн страдают ожирением, что существенно повышает риск развития кардиометаболических нарушений. При этом длительное применение современных фармакологических средств (статинов, гипогликемических препаратов) часто ограничено из-за развития побочных эффектов (гепатотоксичность, миопатия, гипогликемические состояния) и высокой стоимости курсового лечения, что особенно актуально для пациентов молодого и среднего возраста.

В данном контексте особый научный и практический интерес представляют биологически активные добавки (БАД) на основе стандартизированных растительных экстрактов, предназначенные для первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых (мозговой инсульт, инфаркт миокарда) и метаболических нарушений (дислипидемия, нарушения углеводного обмена, метаболический синдром). Согласно систематическому обзору клинических и экспериментальных исследований, опубликованному нами ранее, растительные комплексы демонстрируют благоприятный профиль безопасности и минимальную дозозависимую токсичность при длительном применении начиная с молодого возраста. Это особенно важно, так как современные исследования показывают, что раннее начало профилактики (до развития клинических проявлений) позволяет снизить риск кардиоваскулярных событий на 25–30 % в последующие 10 лет.

Ключевым аспектом разработки таких комплексов является отбор компонентов с доказанным мягким гипогликемическим, умеренным гиполипидемическим и физиологичным гипотензивным действием, проявляющих синергетические эффекты, что повышает терапевтическую активность, расширяет спектр действия и снижает побочные эффекты. Это может достигаться, в частности, за счет повышения биодоступности и активности отдельных веществ в составе сбора, способных одновременно воздействовать на различные звенья патогенеза ожирения, ассоциированных с ним метаболических расстройств.

© И. Ю. Деулин, А. В. Троицкий, С. В. Янковская, В. Г. Селятицкая, М. И. Воевода, 2025

В настоящий момент нами разработана и оптимизирована фитокомпозиция «Бергамот 350», содержащая стандартизированные экстракты бергамота (*C. bergamia*), диоскореи (*D. villosa*), барбариса (*B. vulgaris*) и маки перуанской (*L. meyenii*), отобранные на основе системного анализа современных фармакологических данных. В ходе исследования мы установили, что используемые растительные компоненты демонстрируют выраженное антиатеросклеротическое, гипогликемическое и гипотензивное действие, что обусловлено наличием в их составе уникального комплекса биоактивных веществ, включая биофлавоноиды, фитоэстрогены и алкалоиды с подтвержденной фармакологической активностью. Особую значимость полученных результатов подчеркивает выявленное нами синергическое взаимодействие компонентов комплекса, когда их совместное действие превосходит простую сумму эффектов отдельных составляющих. Это принципиально важное наблюдение позволило создать высокоэффективное средство для профилактики сердечно-сосудистых и метаболических нарушений, обладающее рядом существенных преимуществ перед существующими аналогами. Полученные данные убедительно свидетельствуют о перспективности использования данного комплекса не только в качестве БАД, но и как основы для создания новых лекарственных препаратов после проведения необходимого комплекса клинических испытаний. Прикладное значение работы заключается в возможности разработки на основе изученной фитокомпозиции эффективных и безопасных средств профилактики широкого спектра социально значимых заболеваний, что может внести существенный вклад в решение актуальных задач современного здравоохранения по снижению заболеваемости и улучшению качества жизни населения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-320

ЭТАНОЛАМИД СТЕАРИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ МОДУЛИРУЕТ ГЛИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ У МЫШЕЙ

STEARIDONIC ACID ETHANOLAMIDE MODULATES GLIAL ACTIVITY IN MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY IN MICE

А. А. Егораева, И. В. Манжуло, Д. Н. Ивашкевич

Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

A. A. Egoraeva, I. V. Manzhulo, D. N. Ivashkevich

A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok

✉ egoraeva_a@bk.ru

Аннотация

Нейровоспалительная реакция играет ключевую роль в развитии вторичных повреждений после легкой черепно-мозговой травмы. Важнейшими регуляторами воспалительных процессов выступают микроглия и астроглия. В данной работе представлена характеристика нового липидного соединения, способного подавлять патологическое нейровоспаление и модулировать активность глиальных клеток.

Abstract

Neuroinflammatory response plays a key role in the development of secondary damage after mild traumatic brain injury. Microglia and astroglia are the most important regulators of inflammatory processes. This article presents the characteristics of a new lipid compound that is capable of suppressing pathological neuroinflammation and modulating the activity of glial cells.

Черепно-мозговые травмы (ЧМТ) являются основной причиной смерти и инвалидности населения во всем мире. Среди всех зарегистрированных случаев именно легкие черепно-мозговые травмы (лЧМТ) составляют большую часть — 70–90 %. Симптомы лЧМТ часто разрешаются в течение нескольких недель, но отдаленные последствия, проявляющиеся через годы, представляют собой значительную проблему как для пациента, так и для системы здравоохранения [1]. Вероятно, это связано с активацией вторичных патологических механизмов, которые запускают нейровоспалительную реакцию и тем самым способствуют продолжающейся нейродегенерации и неврологической дисфункции. Микроглия и астроглия являются важными модуляторами нейроиммунного ответа. Они инициируют воспалительный каскад, секретируя про- и противовоспалительные цитокины, хемокины, факторы роста; участвуют в фагоцитозе поврежденных клеток и клеточного детрита; модулируют клеточные реакции [2, 3]. Регулирование активности глии и ингибирование нейровоспалительной реакции в хроническом посттравматическом периоде являются эффективной стратегией для устранения отсроченных последствий травмы. В связи с этим особый интерес представляют N-ацилэтаноламины (NAE) — группа эндогенных липидных молекул, обладающих широкой биологической активностью. Они участвуют в регуляции пищевого поведения, когнитивных функций, настроения и системы вознаграждения. Помимо этого, они в несколько десятков раз превосходят по эффективности своих метаболических предшественников — омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты, проявляя противовоспалительную активность и усиливая выработку нейротрофинов [4–6]. Поэтому данная работа посвящена изучению влияния этаноламида стеаридоновой кислоты на регуляцию активности микро- и астроглии в хроническом посттравматическом периоде (11 недель).

Этаноламид стеаридоновой кислоты (ЭСДК) был получен из жира *Sardinops melanostictus* по методу, разработанному в лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН [7]. Эксперимент проводили в течение 11 недель на 60 самцах мышей линии C57BL/6, разделенных на 4 группы: «Контроль» (n = 15), «Контроль + ЭСДК» (n = 15), «лЧМТ» (n = 15), «лЧМТ + ЭСДК» (n = 15). ЭСДК (10 мг/кг) вводили за 2 дня до травмы, в день травмы и в течение 7 дней после травмы. Морфологическое состояние ткани головного мозга оценивали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином, а микро- и астроглиальную активность — иммуногистохимическим окрашиванием на Iba-1 и GFAP соответственно, как в коре головного мозга, так и в CA1-регионе гиппокампа. Дополнительно были проведены Real-Time PCR (RT-PCR) для оценки экспрессии микроглиальных (*cd68*, *cd206*), астроглиальных (*gfap*, *c3*, *s100a10*, *clcf1*) генов и выполнен вестерн-блот-анализ уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ1β, ИЛ6, ФНОα) в коре головного мозга и в гиппокампе.

© А. А. Егораева, И. В. Манжуло, Д. Н. Ивашкевич, 2025

После эвтаназии экспериментальных животных и гистологического исследования ткани головного мозга субдуральных и внутримозговых кровоизлияний не отмечалось. Однако при иммуногистохимическом окрашивании установлено, что уровни как астроглиального (GFAP), так и микроглиального (Iba-1) маркеров в группе «лЧМТ» достоверно увеличивались ($p < 0{,}001$) относительно группы «Контроль» как в коре головного мозга, так и в CA1-регионе гиппокампа. При этом спустя 11 недель после травмы экспрессия провоспалительных маркеров *gfap*, *c3* и *cd68*, а также уровень провоспалительных цитокинов ИЛ1β, ИЛ6, ФНОα оставались повышенными как в коре, так и в гиппокампе, что указывает на поляризацию астроглии в сторону фенотипа A1 и микроглии в сторону фенотипа M1. В то же время иммуногистохимический анализ показал, что терапия ЭСДК в группе «лЧМТ+ ЭСДК» приводила к снижению количества клеток, экспрессирующих активированную астроглию (GFAP) и микроглию (Iba-1), до уровня контрольных значений ($p < 0{,}001$) как в коре, так и в CA1-регионе гиппокампа. Также наблюдалась активация астроглии A2-фенотипа, сопровождающаяся увеличением экспрессии маркеров *s100a10* и *clcf1*, которые обладают нейротрофическим эффектом и способны поддерживать выживаемость двигательных и симпатических нейронов. Кроме того, наблюдалось увеличение экспрессии маркера *cd206*, что указывает на поляризацию микроглии/макрофагов в M2-направлении.

Таким образом, в нашем исследовании показано, что в хроническом посттравматическом периоде астроглия и микроглия остаются активированными и экспрессируют ряд провоспалительных молекул. Терапия ЭСДК сопровождалась поляризацией глиальных клеток преимущественно в сторону фенотипов A2 и M2, что может свидетельствовать о ее противовоспалительном потенциале при терапии травм центральной нервной системы.

Литература

1. George K. K., Heithoff B. P., Shandra O., Robel S. Mild Traumatic Brain Injury/Concussion Initiates an Atypical Astrocyte Response Caused by Blood–Brain Barrier Dysfunction // Journal of Neurotrauma. 2022. Vol. 39 (1–2). P. 211–226.

2. Nespoli E., Hakani M., Hein T. M. et al. Glial cells react to closed head injury in a distinct and spatiotemporally orchestrated manner // Scientific reports. 2024. Vol. 14 (1). P. 2441.

3. Mira R. G., Lira M., Cerpa W. Traumatic Brain Injury: Mechanisms of Glial Response // Frontiers in Physiology. 2021. Vol. 21.

4. Mock E. D., Gagestein B., van der Stelt M. Anandamide and other N-acylethanolamines: A class of signaling lipids with therapeutic opportunities // Progress in Lipid Research. 2023. Vol. 89. P. 101194.

5. Manzhulo I, Tyrtyshnaia A, Egoraeva A. et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic activity of synaptamide improves the morphological state of neurons in traumatic brain injury // Neuropharmacology. 2024. Vol. 258. P. 110094.

6. Manzhulo I., Egoraeva A., Ivashkevich D. et al. Synaptamide regulates astroglial functional activity after cerebral cortex injury // Inflammopharmacology. 2025.

7. Latyshev N. A., Ermolenko E. V., Kasyanov S. P. Concentration and purification of polyunsaturated fatty acids from squid liver processing wastes // European Journal of Lipid Science and Technology. 2014. Vol. 116. P. 1608–1613.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-321

ВЫРАЖЕННОСТЬ ФЕНОТИПА TRAINED IMMUNITY В МОНОЦИТАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МОДУЛЯТОРАМИ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

EXPRESSION OF BCG-INDUCED TRAINED IMMUNITY PHENOTYPE IN MONOCYTES EXPOSED TO MODULATORS OF METABOLIC PATHWAY ACTIVITY

Е. П. Емельянова, О. В. Семенова, А. В. Салмин, Я. Ш. Шварц

Новосибирский НИИ туберкулеза

E. P. Emelyanova, O. V. Semenova, A. V. Salmin, Ya. Sh. Schwartz

Novosibirsk Research Institute of Tuberculosis

✉ e.emelianova@alumni.nsu.ru

Аннотация

В работе показано, что можно влиять на выраженность фенотипа неспецифической иммунологической памяти (trained immunity, TI) клеток врожденного иммунитета через модуляцию метаболических путей. Установлено, что в культуре моноцитов человека мевалонат и золедроновая кислота значительно усиливают БЦЖ-индуцированный TI. Итаконат ингибирует действие БЦЖ, подавляя TI.

Abstract

The work shows that it is possible to influence the expression of the trained innate immunity (TI) through modulation of metabolic pathways. It was found that in the culture of human monocytes, mevalonate and zoledronic acid significantly enhance BCG-induced TI. Itaconate inhibits the action of BCG, suppressing TI.

Введение

В последние годы концепция неспецифической иммунологической памяти врожденного иммунитета — trained immunity (TI) — стала перспективной областью исследований в иммунологии [1, 2]. Макрофаги, моноциты и NK-клетки после контакта с микроорганизмами способны формировать долговременную функциональную перестройку, связанную с «запоминанием» [3]. В ее основе лежит ремоделирование метаболических путей, активация аэробного гликолиза и эпигенетическое репрограммирование, повышающее доступность ДНК для транскрипции в области провоспалительных генов [4]. Вакцинный штамм БЦЖ — один из главных индукторов TI [1–3]. Мы предполагаем, что модуляция метаболических путей мевалонатом, итаконатом и ингибитором мевалонатного пути — аминобисфосфонатом (золедроновая кислота) — может регулировать выраженность TI. Цель исследования — оценить влияние мевалоната, итаконата и золедроновой кислоты на БЦЖ-индуцированный фенотип TI в моноцитах человека.

Материалы и методы

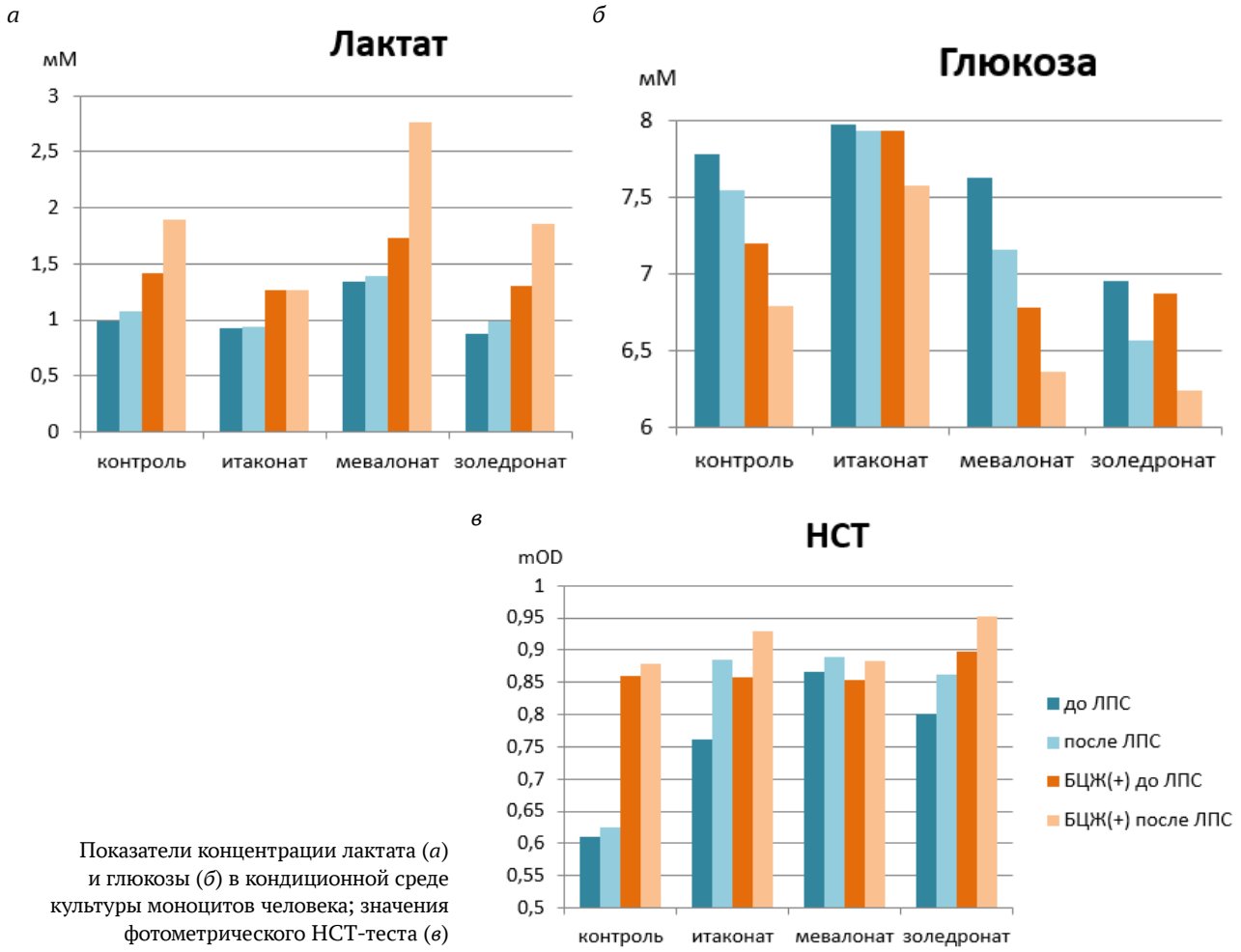
Моноциты получали из крови здоровых доноров по методу Bouym (1968) и культивировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2. Для индукции TI к клеткам добавляли живой вакцинный штамм БЦЖ (5 мкг/мл), инкубируя 24 ч, затем удаляли нефагоцитированные бактерии. Вносили 1 мМ мевалоната, 250 мкМ итаконата и 50 мкМ золедроновой кислоты в интактные и праймированные клетки, инкубируя 7 дней с заменой среды каждые 3 дня. На 8-й день добавляли ЛПС *E. coli* O111:B4. В качестве контроля использовали интактные моноциты и праймированые БЦЖ. Уровень лактата и глюкозы измеряли наборами «Лактат-Ново» и «Глюкоза-Ново», выработку активных форм кислорода — с помощью НСТ-теста. Статистическую обработку проводили с помощью Statistica 10.0, оценивали нормальность распределения тестом Шапиро — Уилка, считая результаты значимыми при $p < 0{,}05$.

Результаты

По усилению продукции лактата и потребления глюкозы верифицировали характерные для TI изменения в моноцитах человека (см. рисунок).

Продукция лактата БЦЖ-праймированными клетками достоверно выше, чем интактными до и после стимуляции ЛПС на фоне активного потребления глюкозы — это свидетельствует о метаболических изменениях, связанных с TI. Добавление итаконата не влияло на продукцию лактата и потребление глюкозы клетками до и по-

© Е. П. Емельянова, О. В. Семенова, А. В. Салмин, Я. Ш. Шварц, 2025



Показатели концентрации лактата (*а*) и глюкозы (*б*) в кондиционной среде культуры моноцитов человека; значения фотометрического НСТ-теста (*в*)

сле воздействия ЛПС, но повышало выработку клетками активных форм кислорода. На фоне действия мевалоната продукция лактата БЦЖ-праймированными моноцитам увеличилась в 2 раза после разрешающего стимула ЛПС при достоверном снижении уровня глюкозы в среде. Мевалонат достоверно повышал выработку клетками активных форм кислорода. Золедронат, так же как и мевалонат, усиливал продукцию лактата и потребление глюкозы БЦЖ-праймированными и интактными клетками, а также усиливал выработку активных форм кислорода, особенно синергично с БЦЖ.

Таким образом, мевалонат и золедроновая кислота способны самостоятельно индуцировать в моноцитарных клетках метаболические изменения, связанные с формированием фенотипа TI. При этом они потенцируют БЦЖ-индуцированный TI. Итаконат отменяет переход клеток с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз, отменяя БЦЖ-индуцированный TI.

Литература

1. Алексеенко И. В., Василов Р. Г., Кондратьева Л. Г. и др. Клеточные и эпигенетические аспекты программирования тренированного иммунитета и перспективы создания универсальных вакцин в преддверии учащающихся пандемий // Генетика. 2023. Т. 59, № 9. С. 981–1001.

2. Mihai G., Netea M. G., Domínguez Andrés J., Barreiro L. B. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease // Nature Reviews Immunology. 2020. Vol. 20, No. 6. P. 375–388.

3. Bekkering S., Domínguez Andrés J., Joosten L. A. B. et al. Reprogramming innate immunity in health and disease // Annual Review of Immunology. 2021. Vol. 39, No. 3. P. 667–693.

4. Johansson A., Lin D. S., Mercier F. E. et al. Trained immunity and epigenetic memory in long term self renewing hematopoietic cells // Experimental Hematology. 2023. Vol. 121. P. 6–11.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-322

НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧЕТЫРЕХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ *

NOVEL BIOMARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RHEUMATOID ARTHRITIS: COMPARATIVE ANALYSIS OF FOUR RHEUMATIC DISEASES

Е. А. Ермаков[1,2], М. М. Меламуд[1], А. С. Толмачева[1], Т. С. Новикова[1], А. Э. Сизиков[1], Г. А. Невинский[1,2], В. Н. Бунева[1,2]

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

E. A. Ermakov[1,2], M. M. Melamud[1], A. S. Tolmacheva[1], T. S. Novikova[1], A. E. Sizikov[1], G. A. Nevinsky[1,2], V. N. Buneva[1,2]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*

✉ evgeny_ermakov@mail.ru

Аннотация

Алармины могут представлять собой потенциальные биомаркеры ревматических заболеваний. В работе проведен анализ концентрации ряда аларминов геномного и митохондриального происхождения при четырех распространенных ревматических заболеваниях. В результате идентифицированы новые потенциальные биомаркеры для дифференциальной диагностики ревматоидного артрита.

Abstract

Alarmins may be potential biomarkers of rheumatic diseases. In this work, the concentration of a number of alarmins of genomic and mitochondrial origin was analyzed in four common rheumatic diseases. As a result, new potential biomarkers for the differential diagnosis of rheumatoid arthritis were identified.

Алармины, или молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), являются мощными активаторами воспалительного ответа и участвуют в патогенезе ревматических заболеваний. Алармины выделяются при повреждении или гибели клеток и могут происходить из различных компартментов клетки. К аларминам ядерного происхождения относится циркулирующая внеклеточная ДНК (вкДНК), цитруллинированный гистон H3 (citH3), ядерные белки high-mobility group protein B1 (HMGB1) и high-mobility group nucleosome-binding domain 1 (HMGN1). Среди аларминов митохондриального происхождения можно выделить митохондриальную вкДНК и некоторые белки. При этом существующие данные о концентрации аларминов в крови при ревматических заболеваниях ограничены, хотя они могут оказаться перспективными биомаркерами.

Цель работы заключалась в исследовании концентрации ряда аларминов ядерного (циркулирующая вкДНК, citH3, ядерные белки HMGB1 и HMGN1) и митохондриального происхождения (митохондриальная вкДНК и белок X, название которого нельзя раскрыть в связи с патентованием) в крови пациентов при четырех распространенных ревматических заболеваниях в сравнении со здоровыми лицами с целью идентификации потенциальных биомаркеров этих заболеваний.

Материалы и методы

Для анализа использована плазма пациентов с ревматоидным артритом (РА, n = 89), анкилозирующим спондилитом (АС, n = 67), системной красной волчанкой (СКВ, n = 36), псориатическим артритом (ПсА, n = 33) и здоровых доноров (n = 86). Концентрация вкДНК определена методом флуориметрического анализа набором Qubit dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit 4 (ThermoFisher, Германия) после предварительного выделения из плазмы с помощью набора D-Blood-250 (Biolabmix, Россия). Анализ числа копий геномной и митохондриальной вкДНК проведен методом цифровой ПЦР в системе QIAcuity (Qiagen, Германия). Концентрацию citH3, HMGB1, HMGN1, митохондриального белка X и антител к ДНК и HMGB1 определяли методом иммуноферментного анализа.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-15-00357).

© Е. А. Ермаков, М. М. Меламуд, А. С. Толмачева, Т. С. Новикова, А. Э. Сизиков, Г. А. Невинский, В. Н. Бунева, 2025

Результаты

Средний возраст включенных в исследование участников значимо не различался (см. таблицу). Сравнительный анализ четырех ревматических заболеваний показал, что концентрация вкДНК и citH3 повышалась только у пациентов с СКВ. Интересно, что при СКВ повышение уровня вкДНК происходило за счет геномной ДНК, в то время как митохондриальная вкДНК снижалась. У пациентов с СКВ также повышался уровень антител к двухцепочечной ДНК. Концентрация HMGB1 повышалась в большей степени при СКВ, но также была выше при РА и АС, а при ПсА не изменялась. При СКВ также повышался уровень анти-HMGB1-антител. Концентрация HMGN1 и митохондриального белка X повышалась исключительно при РА. HMGN1 и белок X продемонстрировали хороший диагностический потенциал в качестве предикторов РА и здоровых лиц (AUC: 0,87 и 0,81, $p < 0{,}00001$ соответственно). Примечательно, что концентрация HMGN1 и митохондриального белка X повышалась даже у некоторых серонегативных пациентов с РА.

Клинические характеристики участников и концентрация ряда аларминов в плазме пациентов с ревматическими заболеваниями

Параметр	СКВ (*n* = 36)	РА (*n* = 89)	АС (*n* = 67)	ПсА (*n* = 33)	Здоровые лица (*n* = 86)
Возраст, годы	41,8 ± 15,3	49,1 ± 14,2	43,9 ± 11,4	46,13 ± 13	41,6 ± 19,5
Длительность заболевания, годы	7,4 ± 7	9,7 ± 8	15,3 ± 11,1	13,2 ± 11,1	–
вкДНК, нг/мл	23,9 [16,0–35,2] *, #	15,0 [9,9–39,7]	18,4 [10,3–46,6]	16,33 [10,9–19,6]	16,3 [9,0–29,4]
CitH3, нг/мл	1,33 [0,76–2,53] *, #	0,79 [0,64–1,01]	0,73 [0,57–0,86]	0,74 [0,57–0,88]	0,64 [0,55–0,91]
HMGB1, нг/мл	21,8 [14,8–33,0] *, #	14,9 [8,9–23,1] *	13,0 [8,1–19,5] *	11,3 [5,6–20,1]	8,6 [5,9–12,3]
HMGN1, пг/мл	0 [0–0]	700 [140–2800] *, #	0 [0–210]	0 [0–0]	0 [0–0]
Белок X, пг/мл	70 [0–700]	2770 [730–6130] *, #	640 [0–1230]	160 [0–820]	440 [0–830]
Анти-ДНК-антитела, нг/мл	21 [5–122] *, #	2,6 [0,2–3,3] *	1,8 [0,2–2,9]	1,1 [0–1,8]	0,4 [0–0,8]
Анти-HMGB1-антитела, нг/мл	1,1 [6,8–3,1] *, #	0,7 [1,0–1,2]	0,6 [0,7–1,5] *	0,5 [0–1,1]	0,2 [0–0,6]

Примечание. Данные представлены как среднее ± SD или медиана [Q1–Q3]; * — значимые отличия ($p < 0{,}05$) в сравнении с контрольной группой, # — значимые отличия ($p < 0{,}05$) в сравнении с другими ревматическими заболеваниями. Применен критерий Краскела — Уоллиса с апостериорным тестом Данна.

Заключение

Увеличение концентрации вкДНК, citH3 и HMGB1 при СКВ может быть связано с активной гибелью нейтрофилов путем нетоза. Поэтому полученные нами данные указывают на важную роль нетоза в патогенезе СКВ, но не других изученных заболеваний. Кроме того, в рамках работы идентифицированы белки HMGN1 и митохондриальный белок X как новые потенциальные биомаркеры для дифференциальной диагностики РА.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-323

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК С LYSM-МОТИВОМ, ИЗ *PIERIS RAPAE* В *ESCHERICHIA COLI* *

A GENE ENCODING A LYSM MOTIF-CONTAINING PROTEIN FROM *PIERIS RAPAE* EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

Е. Г. Ерохина, Е. Ю. Эпова, Е. В. Трубникова, Е. Д. Никольская, И. Н. Курочкин

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

E. G. Erokhina, E. Yu. Epova, E. V. Trubnikova, E. D. Nikolskaya, I. N. Kurochkin

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

✉ kate_sh_1@mail.ru

Аннотация

В работе проведено клонирование гена, кодирующего белок с мотивом LysM, из бабочки *Pieris rapae* в экспрессионный вектор pET-28b(+). Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* Tuner (DE3). В ходе ферментации полученных трансформантов были подобраны оптимальные условия для экспрессии целевого гена: конечная концентрация IPTG — 0,1 мМ, время индукции — 4 ч, температура — 37 °C.

Abstract

In this study the gene encoding a LysM motif-containing protein from *Pieris rapae* was cloned into the pET-28b(+) expression vector. The plasmid with target gene was used to transform *E. coli* Tuner (DE3) cells. During fermentation of the obtained transformants optimal conditions for target gene expression were determined: final IPTG concentration — 0,1 mM, induction time — 4 h, temperature — 37 °C.

В настоящее время в связи с массовым и бесконтрольным использованием антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях проблема быстрого распространения антибиотикорезистентности среди бактериальных популяций приобрела широкий масштаб. В этой связи актуальность приобретает создание высокочувствительных диагностических систем для раннего выявления инфекций, что позволит при необходимости применять препараты узкого спектра действия против конкретного возбудителя [1, 2]. На ранних этапах развития бактериальной инфекции биологические жидкости организма содержат небольшое количество бактериальных клеток, которые можно концентрировать с помощью функционализированных магнитных частиц, покрытых молекулами, связывающимися с компонентами бактериальной мембраны или клеточной стенки [3].

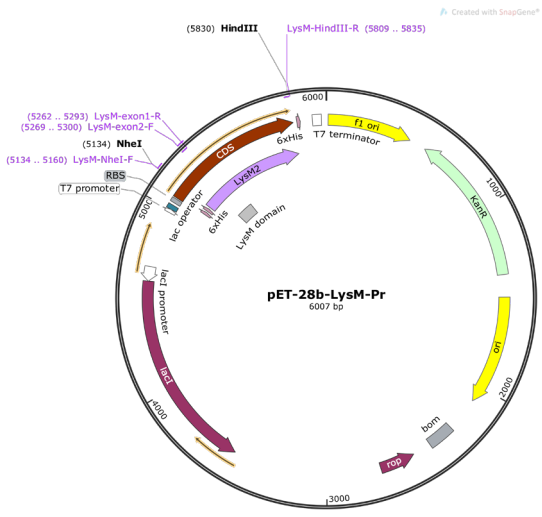


Рис. 1. Карта плазмиды pET-28b-LysM-Pr, предназначенной для экспрессии белка с мотивом LysM из *P. rapae* в клетках *E. coli*

Для получения функционализированных магнитных частиц мы предлагаем использовать белок из бабочки *P. rapae*, содержащий мотив LysM. Белки с мотивом LysM широко распространены у различных видов бактерий, фагов, растений и животных [2]. Мотив LysM представляет собой функциональный домен из 40–65 аминокислот, который может связываться с углеводами, содержащими N-ацетилглюкозамин, такими как пептидогликаны, хитин и их производные [1].

Цель настоящей работы — клонирование гена, кодирующего белок из *P. rapae*, содержащий LysM-мотив, его экспрессия в *E. coli* и подбор оптимальных условий ферментации для максимального выхода белка.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 1240613000029 по теме «Создание химикоаналитических систем на основе сверхчувствительных методов нанофотоники для мониторинга биологических рисков и предотвращения связанных с ними угроз».

© Е. Г. Ерохина, Е. Ю. Эпова, Е. В. Трубникова, Е. Д. Никольская, И. Н. Курочкин, 2025

Ген, кодирующий белок с мотивом LysM (230 а. о.), был получен из хромосомы *P. rapae* методом ПЦР с перекрывающимися праймерами и клонирован в вектор pET-28b(+) по сайтам NheI/HindIII (рис. 1).

Наличие LysM-мотива было подтверждено секвенированием по Сэнгеру.

Полученную плазмиду pET-28b-LysM-Pr трансформировали в клетки *E. coli* Tuner (DE3). Трансформанты высевали на среду с канамицином в конечной концентрации 50 мкг/мл и проверяли на наличие pET-28b-LysM-Pr методами ПЦР и рестрикции.

Для определения наилучших условий экспрессии целевого гена в клетках *E. coli* Tuner (DE3)/pET-28b-LysM-Pr ставили ряд ферментаций, в которых различались температура (30 и 37 °C), концентрация IPTG (0,1, 0,2 и 1 мМ) и время индукции (2, 4 и 20 ч).

После завершения ферментаций проводили белковый электрофорез (рис. 2) в 12%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В качестве образцов использовали отмытую в физрастворе биомассу клеток. Белки окрашивали с использованием 0,1%-го раствора кумасси голубого R250.

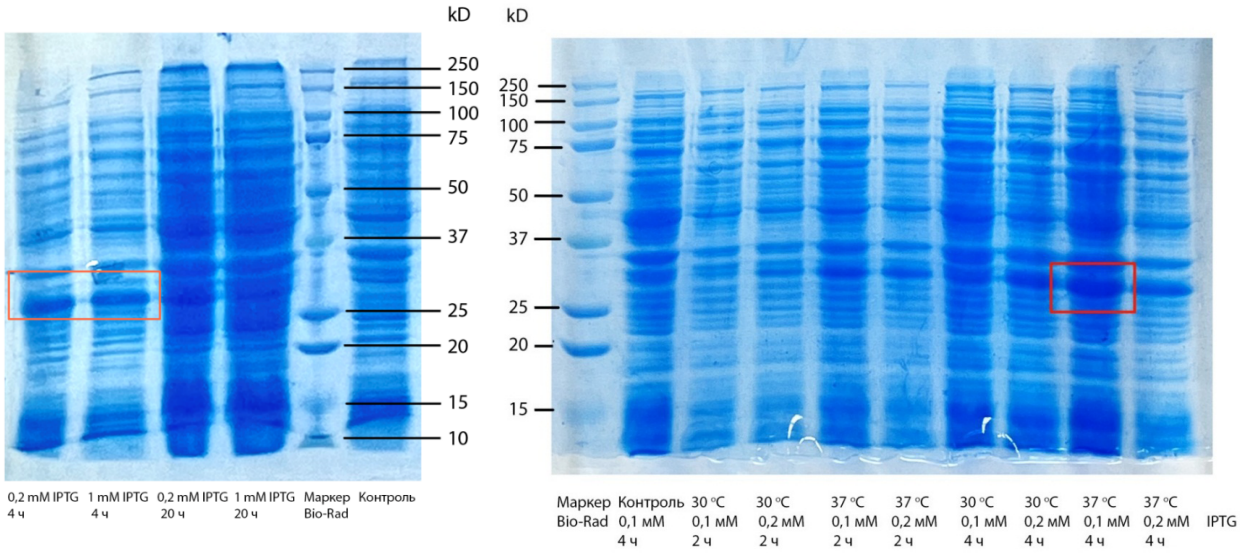


Рис. 2. Электрофорез общего белка трансформантов *E. coli* Tuner (DE3)/pET-28b-LysMPr. Красной рамкой выделена полоса, соответствующая целевому белку, расчетная молекулярная масса которого составляет 28,2 kDa

Анализ электрофореграмм показал, что рекомбинантный белок экспрессируется в клетках *E. coli* Tuner (DE3). Максимальный выход целевого продукта наблюдается в случае индукции работы Т7-промотора 0,1 мМ IPTG в течение 4 ч и культивировании при 37 °C (см. рис. 2).

Литература

1. Buist G., Steen A., Kok J., Kuipers O. P. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans // Molecular Microbiology. 2008. Vol. 8, No. 4. P. 838–847.

2. Visweswaran G. R., Leenhouts K., van Roosmalen M. et al. Exploiting the peptidoglycan binding motif, LysM, for medical and industrial applications // Applied Microbiology and Biotechnology. 2014. Vol. 98, No. 10. P. 4331–4345.

3. Elhariry M. et al. Nanomaterials for bacterial enrichment and detection in healthcare // Nanomedicine. 2025. Vol. 20, No. 9. P. 985–1000.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-324

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАРОТИТНОЙ ИНФЕКЦИИ В Г. МОСКВЕ

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF MUMPS INFECTION IN MOSCOW

Т. Л. Замотаева, Е. А. Черкашин

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

T. L. Zamotaeva, E. A. Cherkashin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

✉ sazonova@pcr.ms

Аннотация

Проведен анализ заболеваемости эпидемическим паротитом в г. Москве в пандемийный и постпандемийный период. Эпидемиологическому анализу также были подвергнуты динамика и возрастная структура заболеваемости, сезонность и охват иммунизацией. На основе полученных результатов сформулированы практические рекомендации по улучшению эпидемиологической ситуации по паротитной инфекции.

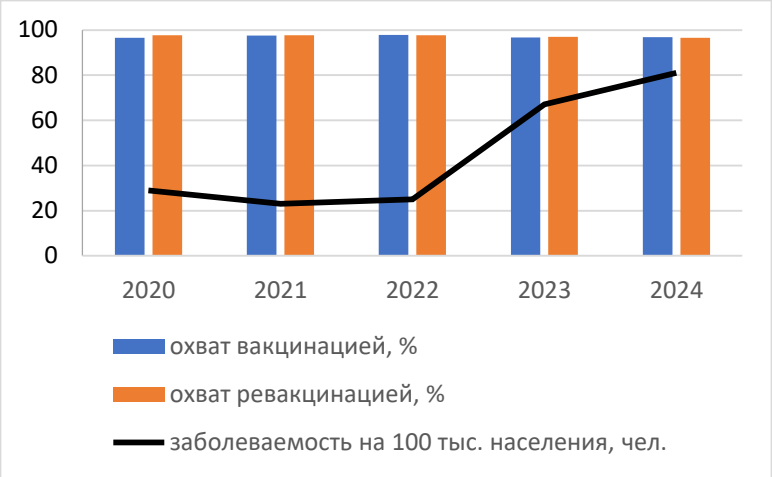
Abstract

We have analyzed the incidence of epidemic mumps in Moscow during the pandemic and post-pandemic period. We also subjected the dynamics and age structure of the incidence, seasonality and immunization coverage to epidemiological analysis. We have formulated practical recommendations for improving the epidemiological situation for mumps infection based on the results obtained.

Эпидемический паротит (ЭП) относится к вирусным заболеваниям, управляемым средствами специфической иммунопрофилактики. Заболеваемость ЭП в Российской Федерации носит спорадический характер. В Москве в допандемийный период отмечалось устойчивое снижение заболеваемости. В период пандемии COVID-19, в отличие от многих других воздушно-капельных инфекций, случаи ЭП продолжали регистрироваться, однако уровень заболеваемости оставался стабильно низким [1, 2].

Согласно данным Государственного доклада, в 2024 г. на территории страны зарегистрировано 2809 случаев ЭП (показатель заболеваемости 1,91 на 100 тыс. населения), что в 2,0 раза больше по сравнению с 2023 г. и в 4,9 раза больше по сравнению с 2022 г. [3–5].

В Москве наблюдалась аналогичная ситуация: в 2024 г. был зарегистрирован 81 случай ЭП (0,62 на 100 тыс. населения), что в 1,2 раза больше по сравнению с 2023 г. (67 случаев, 0,53 на 100 тыс. населения) и в 3,2 раза боль-



Динамика заболеваемости эпидемическим паротитом и охвата своевременной вакцинацией против этой инфекции в Москве в 2020–2024 гг.

© Т. Л. Замотаева, Е. А. Черкашин, 2025

ше по сравнению с 2022 г. (25 случаев, 0,2 на 100 тыс. населения). В возрастной структуре заболевших в постпандемийный период преобладало взрослое население — 64,0; 53,7 и 50,6 % в 2022, 2023 и 2024 гг. соответственно. Эпидемический процесс поддерживался за счет непривитого населения и лиц с неизвестным прививочным анамнезом — 97,5 % от всех заболевших в 2024 г. в Москве. Сезонное распределение случаев ЭП характеризовалось равномерностью, с небольшими подъемами в весенне-летний и осенне-зимний периоды. Охват вакцинацией детей 1-го года жизни составил 97,8; 96,7 % и 96,8 % в 2022, 2023 и 2024 гг. соответственно. Охват ревакцинацией детей в возрасте 6 лет составил 97,7; 96,9 и 96,5 % в 2022, 2023 и 2024 гг. соответственно (см. рисунок).

Несмотря на высокий охват иммунизацией, заболеваемость ЭП в Москве показывает тенденцию к росту, что, вероятно, обусловлено маятниковой миграцией и постоянным притоком населения из стран ближнего зарубежья с неизвестным прививочным анамнезом. В этой связи следует проводить в полном объеме вакцинацию контактных лиц в очагах инфекции, а также подчищающую иммунизацию студентов первых курсов вузов и учреждений среднего профессионального образования.

Литература

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в городе Москве в 2020 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. С. 217.

2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в городе Москве в 2021 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. С. 218.

3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в городе Москве в 2022 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. С. 230.

4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в городе Москве в 2023 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. С. 213.

5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в городе Москве в 2024 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2025. С. 253.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-325

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СИСТЕМНОЙ ДОСТАВКИ АДРЕСНЫХ НАНОСТРУКТУР ДЛЯ ТЕРАПИИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE SYSTEMIC DELIVERY OF TARGETED NANOSTRUCTURES FOR THE THERAPY OF SOCIALLY SIGNIFICANT DISEASES

А. С. Золотарева, В. О. Шипунова

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

A. S. Zolotareva, V. O. Shipunova

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ zolotareva.as@phystech.edu

Аннотация

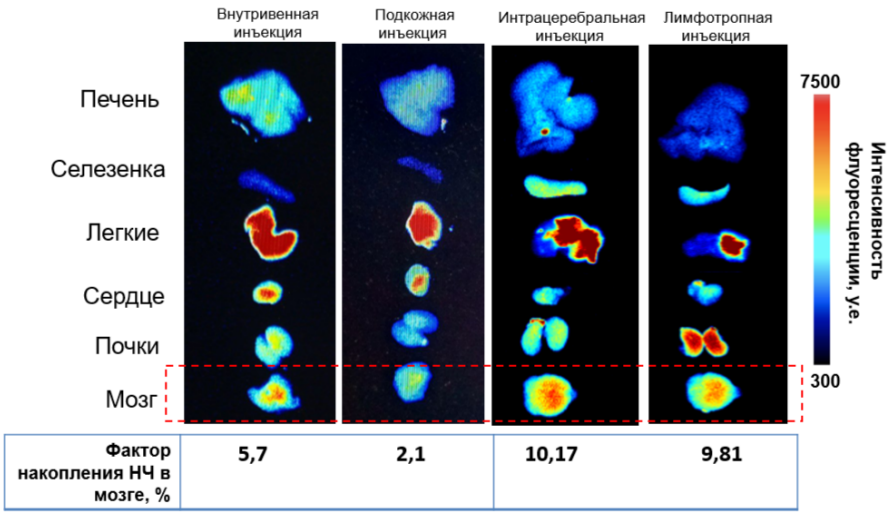
В данной работе был синтезирован ряд белковых наночастиц. Были исследованы различные пути введения этих частиц, а также показана возможность их эффективной доставки в мозг путем лимфотропной инъекции в челюстные лимфоузлы с последующим выявлением их четкой локализации в зоне опухоли. Было обнаружено, что казеиновые наночастицы обладают способностью эффективно проникать через ГЭБ и накапливаться в опухолевых клетках за счет связывания с SPARC-белком.

Abstract

In this work, a number of protein nanoparticles were synthesized. Various ways of introducing these particles were investigated, and the possibility of their effective delivery to the brain by lymphotropic injection into the maxillary lymph nodes was shown, followed by the identification of their clear localization in the tumor area. It was found that casein nanoparticles have the ability to effectively penetrate the BBB and accumulate in tumor cells by binding to SPARC protein.

Опухоли мозга являются одними из наиболее сложных и опасных видов онкологических заболеваний. При этом широкий спектр применяемых для химиотерапии препаратов обладает низкой эффективностью, поскольку они не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Для повышения эффективности преодоления ГЭБ и последующей доставки и высвобождения препаратов в пораженную зону мозга активно разрабатывают инновационные подходы введения лекарственных препаратов с применением биосовместимых наночастиц.

Целью данного исследования являлся поиск наиболее эффективного способа введения наноформуляций *in vivo* для доставки в мозг.



Визуализация распределения CasНЧ/Cy5 в органах мышей BALB/c через 2 ч после введения 1 мг наночастиц размером 30 нм различными путями

© А. С. Золотарева, В. О. Шипунова, 2025

В качестве агентов доставки использовались белковые наночастицы, поскольку они являются природными биоматериалами, что снижает риск токсичности и иммуногенности по сравнению с синтетическими полимерами. С помощью эмульсионного метода синтезировали казеиновые наночастицы (CasНЧ) размерами в диапазоне 30–120 нм. Для визуализации распределения частиц *in vivo* их поверхность модифицировали флуоресцентным красителем, цианином 5 (Cy5). Далее провели сравнительный анализ эффективности доставки частиц в мозг в зависимости от пути введения: лимфотропного, интрацеребрального, внутривенного и подкожного. Анализ распределения наночастиц в органах *ex vivo* (см. рисунок) показал наибольшее накопление наночастиц в головном мозге. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что наиболее эффективно наночастицы доставлялись в мозг, преодолевая ГЭБ, при интрацеребральной и лимфотропной инъекциях. Фактор накопления казеиновых наночастиц в мозге при интрацеребральном введении составил 10,17 %, при этом частицы достигали капилляров мозга за короткое время — в течение 30 мин. Лимфотропное введение позволило CasНЧ/Cy5 достигать мозга за более длительный период времени за счет обхода ГЭБ и попадания в цереброспинальную жидкость, откуда они могли диффундировать в мозговую ткань [1].

Таким образом, различные типы наночастиц и вариации путей их введения позволили выявить лучших кандидатов для наноформуляций для доставки и эффективной локализации в опухоли. В результате мы определили, что синтезированный ряд казеиновых наночастиц позволил регулировать количество проходящих через ГЭБ наночастиц и их локализацию в опухоли, а также что наночастицы размером 30 нм, введенные лимфотропным путем, обладают наибольшей эффективностью проникновения через ГЭБ, что способствует накоплению их в мозге. Качественная оценка накопления наночастиц в мозге продемонстрировала довольно высокие результаты (10,17 %), которые ранее не были зарегистрированы в исследованиях подобного рода.

Литература

1. Tran S., DeGiovanni P., Piel B., Rai P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery // Clinical and Translational Medicine. 2017. No. 6. P. 270.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-326

УВЕЛИЧЕНИЕ ТОЧНОСТИ ДЕТЕКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ ЭМБРИОНОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДА BIOP-C: КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ *

IMPROVING THE RELIABILITY OF DETECTING CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN EMBRYOS USING THE BIOP-C METHOD: A CLINICAL CASE

А. М. Иванов[1], А. А. Попов[2], Я. К. Степанчук[1,3,4], М. М. Гридина[1,3,4], В. С. Фишман[1,3,4]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Сколковский институт науки и технологий, Москва*
[3]*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*
[4]*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*

A. M. Ivanov[1], A. A. Popov[2], Ya. K. Stepanchuk[1,3,4], M. M. Gridina[1,3,4], V. S. Fishman[1,3,4]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[3]*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk*
[4]*Sirius University of Science and Technology, Sochi*

✉ biophysinf@gmail.com

Аннотация

Сбалансированные транслокации у родителей приводят к возникновению у эмбрионов сбалансированных и несбалансированных хромосомных перестроек. Используемые в клинике платформы ПГТ-А не предоставляют информации о сбалансированных перестройках у эмбриона, в отличие от разработанного нами метода Biop-C. Кроме того, в рассматриваемых случаях Biop-C позволил определить наличие делеций и дупликаций точнее, чем ПГТ-А.

Abstract

Balanced translocations in parents lead to the formation of both balanced and unbalanced chromosomal rearrangements in embryos. Clinical PGT-A platforms can not detect balanced translocations in the embryo, unlike our developed Biop-C method. Additionally, in the analyzed cases, Biop-C allowed for more accurate detection of deletion and duplication compared to CGH-array-based PGT-A.

Наличие сбалансированной транслокации у родителя является частой причиной бесплодия. По разным оценкам, среди пар с бесплодием частота носительства сбалансированных транслокаций составляет от 2 до 7 % [1]. Детекция транслокаций у эмбриона в ходе преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) даст возможность выбрать эмбрион без сбалансированных хромосомных перестроек. Одобренные для клинической практики и экономически доступные платформы ПГТ-А не позволяют определять сбалансированные транслокации у эмбриона. Нами был разработан метод Biop-C на основе усовершенствованного протокола Hi-C-секвенирования [2] с низким покрытием, позволяющий совмещать автоматическую детекцию как несбалансированных, так и сбалансированных транслокаций на основе математических алгоритмов и определение вариаций копийности участков генома (copy number variation, CNV) с использованием предобученной большой языковой модели GENA-LM [3] и скрытой марковской модели. Кроме практической ценности с точки зрения выбора эмбриона для переноса в ходе ЭКО, результаты работы метода Biop-C позволяют получить информацию о сегрегации хромосом в ходе мейоза у носителей сбалансированных хромосомных перестроек.

Цель исследования — описать кариотипы эмбрионов, полученных от пары с кодовым обозначением Bal, в которой отец имеет сбалансированную транслокацию между 18-й и 21-й хромосомами (46XY,t(18;21)(q22.1;q21.3)). Исследования в рамках проекта по разработке метода Biop-C были одобрены локальной этической комиссией НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосбирск (№ 177, 16.12.2022).

В таблице представлены аномалии копийности, обнаруженные у трех эмбрионов семьи Bal при помощи хромосомного микроматричного анализа (ХМА), а также результаты анализа методом Biop-C и предполагаемый кариотип на основе этих данных с учетом механизма образования несбалансированных транслокаций (рис. 1) и других CNV. Для Bal1 и Bal2 регионы CNV, предсказанные ХМА, не соответствуют ожидаемым для эмбриона от роди-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке конкурса Blue Sky Research «Большие языковые модели для химии и биологии», заявка № BSR-2024-42.

© А. М. Иванов, А. А. Попов, Я. К. Степанчук, М. М. Гридина, В. С. Фишман, 2025

теля с кариотипом 46XY,t(18;21)(q22.1;q21.3). Для Bal3 регион CNV на 18-й хромосоме был разбит на несколько с разным уровнем копийности, что также является маловероятным. Границы CNV, предсказанные методом Biop-C, соответствуют точкам разрыва, найденным при анализе транслокации отца, для эмбрионов также были идентифицированы соответствующие транслокации, что позволило точно описать кариотип эмбрионов (см. таблицу).

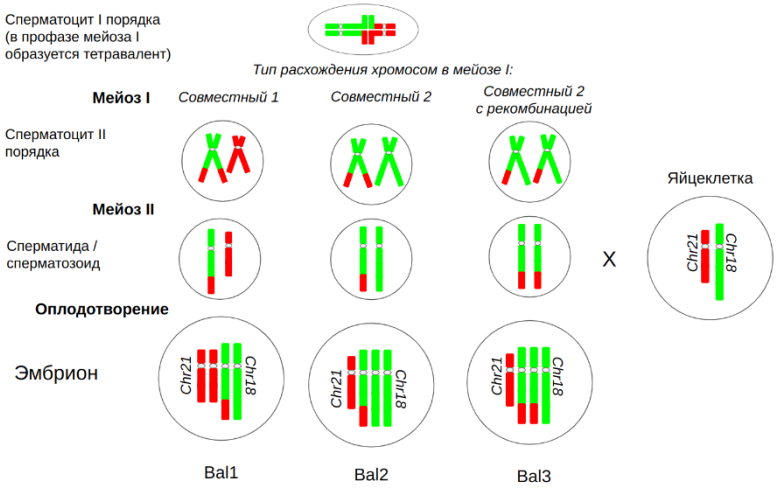


Рис. 1. Механизм возникновения CNV у эмбрионов пары Bal по Benet J. et al. [4], *зеленый*: 18-я хромосома и ее производные, *красный*: 21-я хромосома и ее производные

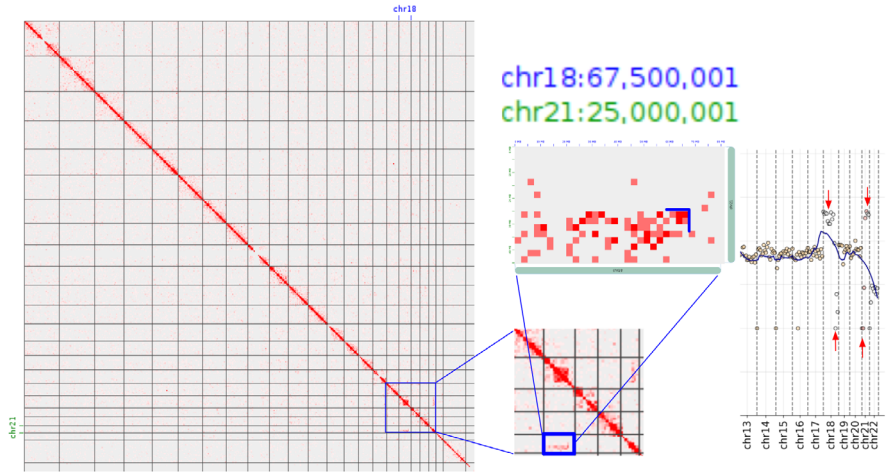


Рис. 2. Матрица контактов и scatter plot покрытия для эмбриона Bal3, видны признаки несбалансированной транслокации

Сравнение предсказаний ХМА и Biop-C с установленным кариотипом

Эмбрион	ХМА	Biop-C	Кариотип
Bal1	(16)x3,(21)x2-3	(16)x3, (18q22.1q23)x1,(21q21.3q22.3) x3, t(18;21)	(16)x3, (18q22.1q23)x1, (21q21.3q22.3)x3, t(18;21) (q22.1;q21.3)
Bal2	(18)x3,(21)x1	(18p11.32q22.1)x3, (21p13q21.3)x1, t(18;21)	(18p11.32q22.1)x3, (21p13q21.3)x1, t(18;21)(q22.1;q21.3)
Bal3	(18p11.32p11.21)x3, (18q11.1q22.1)x3, (18q22.1q23) x1, (21q11.2q21.3)x1, (21q21.3q22.3)x3, (22)x3	(18p11.32q22.1)x3, (18q22.1q23)x1, (21p13q21.3)x1, (21q21.3q22.3)x3, (22) x3, t(18;21)	(18p11.32q22.1)x3, (18q22.1q23)x1, (21p13q21.3)x1, (21q21.3q22.3)x3, (22)x3, t(18;21)(q22.1;q21.3)

Можно прийти к заключению, что в рассмотренном случае метод Biop-C за счет разработанных нами инструментов биоинформационного анализа геномного покрытия и возможности получения информации о транслокациях на основе 3C-данных (рис. 2) в качестве дополнительного «контроля» позволяет более точно, чем платформа ПГТ-А на основе ХМА, определять наличие или отсутствие CNV.

Литература

1. Ching C. B., Ko E., Hecht B. et al. Presentation and treatment of subfertile men with balanced translocations: the Cleveland Clinic experience // Current Urology. 2012. Vol. 6, No. 1. P. 37–42.

2. Gridina M., Taskina A., Lagunov T. et al. Comparison and critical assessment of single cell Hi C protocols // Heliyon. 2022. Vol. 8, No. 10.

3. Fishman V., Kuratov Y., Shmelev A. et al. GENA LM: a family of open source foundational DNA language models for long sequences // Nucleic Acids Research. 2025. Vol. 53, No. 2. P. gkae1310.

4. Benet J., Oliver Bonet M., Cifuentes P. et al. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review // Cytogenetic and Genome Research. 2005. Vol. 111, No. 3–4. P. 281–290.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-327

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТКОВ ОПУХОЛИ, ОБОГАЩЕННЫХ МАКРОФАГАМИ, ПРИ ТРОЙНОМ НЕГАТИВНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *

SPATIAL CHARACTERIZATION OF MACROPHAGE-ENRICHED TUMOR REGIONS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER

А. Ю. Калинчук, И. А. Пацкан, Е. А. Царенкова, Л. А. Таширева

НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН

A. Yu. Kalinchuk, I. A. Patskan, E. A. Tsarenkova, L. A. Tashireva

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS

✉ annakalinchuk2022@gmail.com

Аннотация

Макрофаги являются неотъемлемым компонентом опухолевого микроокружения, обладают высокой пластичностью и отличаются широкой функциональной гетерогенностью. В данном исследовании впервые была изучена ассоциация между топографией инфильтрирующих опухоль макрофагов (интраэпителиальным или стромальным расположением) и их функциональными особенностями у пациентов с трижды негативным раком молочной железы.

Abstract

Macrophages are an integral component of the tumor microenvironment, are highly plastic, and are characterized by broad functional heterogeneity. This study was the first to examine the association between the topography of tumor-infiltrating macrophages (intraepithelial or stromal location) and their functional characteristics in patients with triple-negative breast cancer.

Цель исследования — сравнение пространственного транскриптомного профиля областей опухоли и стромы, обогащенных макрофагами, при трижды негативном раке молочной железы (ТНРМЖ).

Методы

В исследование включено 8 пациенток с ТНРМЖ. Пространственный транскриптомный анализ был проведен на парафиновых срезах, фиксированных в формалине, методом высокопроизводительного секвенирования РНК с применением технологии Visium 10X. Аннотация данных пространственного транскриптомного анализа проводилась в три этапа: отбор спотов, включающих стромальные и опухолевые клетки (интраэпителиальный кластер) и спотов без опухолевых клеток (стромальный кластер), затем в выделенных морфологических кластерах отбирались споты с экспрессией гена CD68, в которых с помощью деконволюции методом оптимального транспорта (TACCO) были определены доли макрофагов от общего числа клеток каждого спота. Такой подход позволил включить в анализ споты с долей макрофагов 15 % и более. Дифференциальный анализ экспрессии генов между группами спотов, обогащенных интраэпителиальными и стромальными макрофагами, проводили с использованием функции FindAllMarkers (пакет Seurat v5.0.0), анализ обогащения по функциональным путям проводили при помощи онлайн-ресурса Enrichr по базе данных Gene Ontology Biological Processes 2025.

Результаты

Пространственные области, обогащенные интраэпителиальными макрофагами, характеризовалась выраженной экспрессией генов лигандов провоспалительных хемокинов (CXCL13, CXCL10, CXCL11, CCL18), генов семейства кальций-связывающих белков (S100A2, S100A14) и металлопротеиназ (MMP1, MMP12). Помимо этого, споты с высокой плотностью интраэпителиальных макрофагов характеризовались повышенной экспрессией и других, значимых с точки зрения функционирования макрофагов, генов, в частности LILRB4 и SERPINB5. Также для данного кластера была характерна повышенная экспрессия генных сигнатур цитокинового и хемокинового сигналинга, регуляции дифференцировки Т-регуляторных клеток, организации межклеточных контактов, заживления ран и процессов ингибирования вирусной активности.

В кластере, обогащенном стромальными макрофагами, была идентифицирована повышенная экспрессия генов, связанных с ангиогенезом и сосудистым ремоделированием (VWF, GPIHBP1, RGS5, SPARCL1), генов вне-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00345).

© А. Ю. Калинчук, И. А. Пацкан, Е. А. Царенкова, Л. А. Таширева, 2025

клеточного матрикса и тканевого ремоделирования (NID1, TNXB, MMRN2, HTRA1), а также иммунорегуляторных генов и маркеров альтернативной активации (CD209, CCL14, FABP4, APOD). Соответственно, в кластере стромальных макрофагов наблюдалась активация функциональных путей, которые участвуют в регулировании ангиогенеза, миграции и рекрутирования клеток, клеточной адгезии и ремоделировании стромы.

Заключение

Сравнение транскриптомных профилей областей опухоли различной топографии с высокой плотностью макрофагов при помощи метода пространственной транскриптомики Visium 10X позволило выявить ассоциацию между функциональными характеристиками макрофагов и их пространственным расположением в микроокружении опухоли при ТНРМЖ. В частности, полученные данные указывают на то, что именно в строме опухоли преобладают макрофаги с проопухолевой М2-подобной поляризацией, которые поддерживают иммуносупрессию, неоангиогенез и инвазивный рост, но в меньшей степени, чем интраэпителиальные макрофаги, участвуют в хемокиновой регуляции миграции лимфоцитов в опухоль. Эти фундаментальные данные открывают перспективы для создания новых прогностических критериев и терапевтических стратегий, направленных на коррекцию опухолевого микроокружения с целью повышения эффективности лечения больных ТНРМЖ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-328

НЕКАНОНИЧЕСКИЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ ОТВЕТ НА ИНСУЛИН В СЕНЕСЦЕНТНЫХ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ НАРУШЕННОГО ГОМЕОСТАЗА*

NON-CANONICAL CALCIUM RESPONSE TO INSULIN IN SENESCENT ADIPOSE TISSUE MESENCHYMAL STEM CELLS AS A POTENTIAL MECHANISM OF CELLULAR ADAPTATION UNDER CONDITIONS OF DISRUPTED HOMEOSTASIS

С. С. Каменков, В. И. Чечехин, А. А. Зиновьева, П. А. Тюрин-Кузьмин, К. Ю. Кулебякин, Е. С. Чечехина

Медицинский научно-образовательный институт МГУ им. М. В. Ломоносова

S. S. Kamenkov, V. I. Chechekhin, A. A. Zinoveva, P. A. Tyurin-Kuzmin, K. Yu. Kulebyakin, E. S. Chechekhina

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University

✉ kams200303@gmail.com

Аннотация

С возрастом в жировой ткани происходит нарушение инсулиновой чувствительности мультипотентных стромальных клеток (МСК). У сенесцентных МСК отмечается переключение клеточного ответа на инсулин с PI3K/Akt сигнального пути на неканонический кальциевый, сопровождающийся ядерным накоплением PTEN. Это может отражать адаптацию клеток к нарушенному гомеостазу.

Abstract

Senescence impairs the insulin sensitivity of multipotent stromal cells (MSCs) in adipose tissue. There is a switch in the cellular insulin response of senescent MSCs, from the canonical PI3K/Akt signaling pathway to a non-canonical calcium-dependent pathway, accompanied by nuclear accumulation of PTEN. This may represent a mechanism of cellular adaptation to disrupted homeostasis.

По мере увеличения средней продолжительности жизни все более актуальным становится изучение заболеваний, связанных со старением. Старение — процесс, ассоциированный с нарушением гомеостатических и регенеративных возможностей органов и тканей, который приводит к развитию различных хронических заболеваний. Так, нарушение обновления жировой ткани при старении может приводить к развитию патологического ожирения и метаболического синдрома. В поддержании гомеостаза жировой ткани важную роль играют мультипотентные стромальные клетки (МСК), обладающие способностью к пролиферации и дифференцировке в адипоциты, а также осуществляющие паракринную регуляцию в ткани. Одним из ключевых функциональных изменений, происходящих в МСК жировой ткани с возрастом, является нарушение их чувствительности к инсулину — ключевому регулятору адипогенной диффренцировки. Развитие инсулинорезистентности МСК является одной из основных причин нарушения обмена жировой ткани при старении. В данной работе показано изменение инсулиновой чувствительности стареющих МСК за счет переключения канонического PI3K/Akt инсулинового ответа МСК на неканонический кальциевый.

МСК были получены из подкожной жировой клетчатки доноров 2 групп — молодых (< 45 лет) и пожилых (> 65 лет). В экспериментах данные клетки были обозначены как «Молодые» и «Сенесцентные» соответственно. Измерение уровня экспрессии белков участников и регуляторов инсулинового каскада проводили методом вестерн-блоттинга с нормировкой на GAPDH и винкулин. Данные о локализации белка внутри клетки были получены методом иммуноцитохимии. Изменение уровня внутриклеточного кальция в ответ на стимуляцию инсулином оценивалось по данным микроскопной съемки с использованием Ca^{2+}-чувствительного флуоресцентного красителя Fluo-8.

Ранее мы показали, что при старении снижается адипогенный потенциал МСК вследствие повышения базального уровня активации канонических инсулиновых PI3K/Akt и MAPK/Erk сигнальных путей [1]. Чтобы подробнее разобраться в механизмах формирования инсулинорезистентности МСК при старении, мы проанализировали экспрессию ключевых белков, регулирующих указанные пути. В результате было выявлено повышение уровня белка PTEN — ингибитора сигнального каскада PI3K/Akt. На первый взгляд, это противоречило ранее зафиксированному высокому базальному уровню активации Akt в данных клетках. Однако иммуноцитохимиче-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-75-30005).

© С. С. Каменков, В. И. Чечехин, А. А. Зиновьева, П. А. Тюрин-Кузьмин, К. Ю. Кулебякин, Е. С. Чечехина, 2025

ский анализ и вестерн-блоттинг с разделением клеточных фракций показали, что увеличение содержания PTEN отмечалось исключительно в ядерной фракции МСК [2].

Известно, что функциональная роль PTEN зависит от его клеточной локализации: в цитоплазме он ингибирует PI3K/Akt сигнальный путь, а в ядре обеспечивает стабильность хромосом и репарацию ДНК [3]. Транслокация PTEN в ядро обусловлена, в частности, участием Ca^{2+} [4]. В связи с этим мы исследовали изменения уровня внутриклеточного кальция в МСК как в покое, так и после стимуляции инсулином. Было обнаружено, что сенесцентные МСК характеризуются повышенной базальной кальциевой активностью по сравнению с молодыми клетками. После добавления инсулина сенесцентные МСК демонстрировали быстрый (в течение нескольких минут) и высокоамплитудный кальциевый ответ, преимущественно в виде осцилляций, тогда как в молодых клетках подобные реакции почти не наблюдались. Для подтверждения того, что изменение кальциевого ответа способствует накоплению PTEN в ядре стареющих МСК, мы сравнили распределение этого белка между ядром и цитоплазмой до и после кратковременного воздействия инсулином. В молодых МСК добавление инсулина не вызывало изменений в локализации PTEN, тогда как в сенесцентных клетках происходило усиленное накопление PTEN в ядре.

Таким образом, нами было показано, что в процессе старения происходит переключение ответа на инсулин с канонического PI3K/Akt на неканонический кальциевый ответ. Обнаруженные осцилляции кальция, по-видимому, представляют собой один из адаптационных механизмов, способствующих поддержанию генетической стабильности в условиях нарушенного клеточного гомеостаза. Ca^{2+}-индуцируемый перенос PTEN в ядро может играть роль в регуляции клеточного цикла, препятствуя чрезмерной пролиферации, что соответствует сниженной пролиферативной активности и адипогенной способности МСК у пожилых доноров. Описанный процесс, вероятно, является одним из ключевых механизмов старения и патогенеза возраст-ассоциированных заболеваний жировой ткани и может быть использован для совершенствования стратегий воздействия на сигнальные пути в стареющих клетках.

Литература

1. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O. et al. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022. Vol. 10. P. 1050489.

2. Chechekhina E., Kamenkov S., Chechekhin V. et al. Extracellular vesicles of adipose multipotent mesenchymal stromal cells propagate senescent phenotype by affecting PTEN nuclear import // International Journal of Molecular Sciences. 2025. Vol. 26, No. 15. P. 7164.

3. Ho J., Cruise E., Dowling R. et al. PTEN nuclear functions // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2020. Vol. 10, No. 5. P. a036079.

4. Yu Z., Fotouhi Ardakani N., Wu L. et al. PTEN associates with the vault particles in HeLa cells // Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277, No. 43. P. 40247–40252.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-329

μ-ОПИОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ КАРДИОПРОТЕКЦИИ*

μ-OPIOID RECEPTORS AS A MOLECULAR TARGET FOR CARDIOPROTECTION

А. Кан, Н. В. Нарыжная, М. Килин, А. Е. Граб

НИИ кардиологии Томского НИМЦ РАН

A. Kan, N. V. Naryzhnaya, M. Kilin, A. E. Grab

Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center RAS

✉ kan989817@gmail.com

Аннотация

Адаптация к непрерывной хронической нормобарической гипоксии (ХНГ) при ишемии/реперфузии оказывает инфаркт-лимитирующий эффект. Данный эффект связан с увеличением содержания μ-опиоидного пептида в ткани миокарда. Метаболический синдром (МС) снижает кардиопротекторную эффективность ХНГ. μ-опиоидные рецепторы могут стать перспективной целью кардиопротекции.

Abstract

Adaptation to continuous chronic normobaric hypoxia (CNH) during ischemia/reperfusion has an infarction-limiting effect. This effect is associated with an increase in the content of μ-opioid peptide in myocardial tissue. Metabolic syndrome (MS) reduces the cardioprotective effectiveness of CNH. μ-opioid receptors may become a promising target for cardioprotection.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания, в особенности острый инфаркт миокарда (ОИМ), до сих пор остаются ведущей причиной смертности в мире. Одним из важных патогенетических факторов ОИМ является ишемическое-реперфузионное повреждение [1]. Перспективным направлением в исследовании кардиопротекторных механизмов является изучение адаптивных реакций организма к состоянию хронической гипоксии, в особенности изучение роли эндогенных агонистов μ-опиоидных рецепторов в инфаркт-лимитирующем эффекте ХНГ. Эти рецепторы могут стать новой мишенью для кардиопротекции. Неясно влияние МС на эффективность ХНГ, его механизмы и инфаркт-лимитирующий эффект агонистов.

Цель исследования — определить роль μ-опиоидных рецепторов (ОР) в кардиопротекторном эффекте у крыс с адаптацией к непрерывной хронической нормобарической гипоксии при метаболическом синдроме.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на крысах Вистар (n = 80) массой 250–300 г. Животные были случайным образом распределены на группы по 10 особей в каждой.

Для моделирования адаптации к непрерывной ХНГ крыс содержали в специальной герметичной камере с уровнем кислорода 12 % в течение 21 дня. Животных извлекали из гипоксической камеры за 24 ч до начала эксперимента [2].

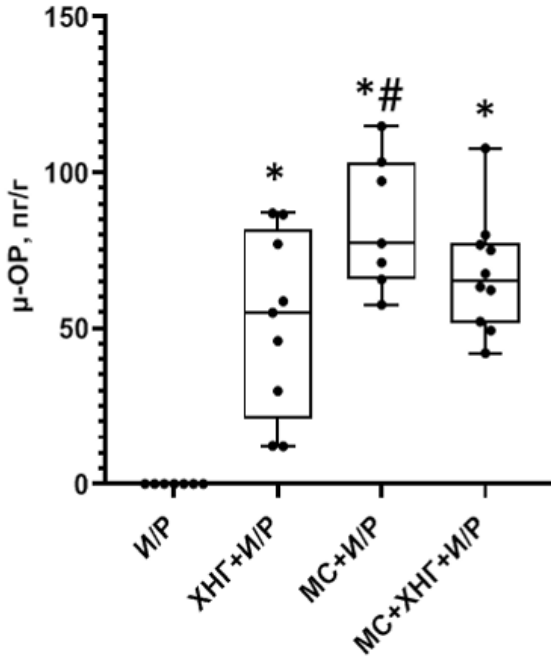
Для моделирования экспериментального инфаркта миокарда наркотизированным животным проводили острую 45-минутную коронарооккклюзию с последующей 2-часовой реперфузией [3]. Выявление зоны некроза и зоны риска проведем по методу, использованному нами ранее [3].

Для экстракции опиоидных пептидов ткань миокарда забирали из зоны ишемии, замораживали в жидком азоте. Замороженную ткань растирали в ступке с жидким азотом, смешивали с 2 мл буфера А и центрифугировали при 6000 g 20 мин при 4 °С. Супернатант переносили в чистые пробирки, не захватывая осевшие частицы.

Исследование содержания μ-опиоидных пептидов в ткани миокарда проводили ELISA наборами E02E0522 эндоморфин-1 (BlueGene, Китай); E02E0143 эндоморфин-2 (BlueGene, Китай). Статистическая обработка данных проведена с использованием статистического пакета Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00048-П).

© А. Кан, Н. В. Нарыжная, М. Килин, А. Е. Граб, 2025



Содержание опиоидных рецепторов в миокарде при адаптации к хронической непрерывной гипоксии, экспериментальном метаболическом синдроме и их сочетанном воздействии.
Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «И/Р»; # — $p < 0,05$ по сравнению с группой «ХНГ + И/Р»

Результаты

ХНГ повышала экспрессию μ-опиоидных рецепторов относительно контроля (рис. 1). Содержание μ-ОР в миокарде крыс с МС было выше, чем в миокарде крыс группы ишемии/реперфузии (И/Р). Значимых различий между группами «МС + И/Р» и «МС + ХНГ + И/Р» отмечено не было.

Измерение уровня опиоидных пептидов в миокарде крыс показало, что содержание эндоморфина-1 во всех группах статистически значимо не изменялось, а содержание эндоморфина-2 было выше в группе «ХНГ + И/Р» по сравнению с «И/Р». На фоне МС количество данного опиоида значимо не изменялось по сравнению с группой «И/Р» (см. таблицу). Однако при адаптации к ХНГ на фоне МС значимо снижался уровень эндоморфина-2 по сравнению с группой «ХНГ + И/Р», при этом его количество было больше, чем у животных групп «И/Р» и «МС + И/Р».

Адаптация к ХНГ оказывала выраженный кардиопротекторный эффект. Размер инфаркта был на 45 % меньше по сравнению с контролем. В то же время у крыс с МС был снижен кардиопротекторный эффект адаптации к ХНГ.

Уровень опиоидных пептидов в миокарде при адаптации к хронической непрерывной гипоксии, экспериментальном метаболическом синдроме и их сочетанном воздействии (Me (Q1; Q2))

Опиоид	Группа			
	1 — И/Р (n = 10)	2 — ХНГ + И/Р (n = 10)	3 — МС + И/Р (n = 10)	4 — МС + ХНГ + И/Р (n = 10)
Эндоморфин-1, пг/мг	0,22(0,21; 0,23)	0,23(0,21; 0,24)	0,22(0,18; 0,32)	0,22(0,21; 0,22)
Эндоморфин-2, пг/мг	1,2(1; 1,9)	16,3(15,1; 18,4) *p1 < 0,001*	2,3(1,7; 2,9) *p2 < 0,001*	11,1(10,2; 13,2) *p1,2,3 < 0,01*

Примечание: $p1$ — по сравнению с группой «И/Р», $p2$ — по сравнению с группой «ХНГ + И/Р», $p3$ — по сравнению с группой «МС + И/Р».

Заключение

Результаты данного исследования показали, что μ-ОР участвуют в инфаркт-лимитирующем эффекте ХНГ. Данный эффект связан с увеличением μ-опиоидного пептида в ткани миокарда. При этом МС снижает кардиопротекторную эффективность ХНГ. Агонисты μ-ОР могут быть мишенью для кардиопротекции, но определение их эффективности требует дальнейших исследований.

Литература

1. Mukhomedzyanov A. V. et al. Signaling mechanisms of the cardioprotective effect of peptide and non-peptide opioid receptor agonists in cardiac reperfusion (literature review) // Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine. 2025. Vol. 40, No. 2. P. 11–20.

2. Mukhomedzyanov A. V. et al. The role of δ_2-opioid receptors in the regulation of tolerance of isolated cardiomyocytes to hypoxia and reoxygenation // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024. Vol. 176, No. 4. P. 433–436.

3. Maslov L. N. et al. Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia // Life Sciences. 2013. Vol. 93, No. 9–11. P. 373–379.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-330

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛГОРИТМОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫХ МОДЕЛЕЙ СЕРДЦА НА ОСНОВЕ ТОМОГРАФИИ*

RESEARCH OF MACHINE LEARNING ALGORITHMS FOR CREATING PERSONALIZED HEART MODELS BASED ON TOMOGRAPHY

В. О. Карнаухова, М. М. Слотвицкий, А. П. Синицына, В. А. Цвелая

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

V. O. Karnaukhova, M. M. Slotvitsky, A. P. Sinitsyna, V. A. Tsvelaya

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ karnauhova01@bk.ru

Аннотация

В работе предложен подход к интерполяции МРТ-изображений стенки левого предсердия с помощью алгоритма RIFE для построения 3D-модели сердца с изотропными вокселями. Метод позволяет повысить точность моделирования и сократить затраты на ручную разметку. Полученная модель прошла верификацию и функциональное тестирование.

Abstract

The paper proposes an approach to interpolating MRI images of the left atrium wall using the RIFE algorithm to build a 3D model of the heart with isotropic voxels. The method allows you to increase the accuracy of modeling and reduce the cost of manual markup. The resulting model has passed verification and functional testing.

Искусственный интеллект в медицине в последнее время начинает развиваться все активнее. Не обошел он и сферу кардиологии. Одно из его возможных применений заключается в тестировании новых лекарственных препаратов на персональной 3D-модели человеческого сердца. Кроме того, в последнее время широко развивается область персонализированной медицины — изучаются условия возникновения аритмий для конкретного пациента, а также предполагается создавать 3D-модели для улучшенного проведения операции абляции и снижения рецидивов в кардиохирургии. Ниже будет описан процесс создания такой модели, а также возможности ее применения.

Основой для 3D-модели сердца являются снимки МРТ грудной клетки. Однако этих снимков недостаточно для построения модели приемлемого качества. Проблема заключается в том, что в исходных МРТ-изображениях шаг по вертикальной оси Z кратно отличается от пространственного разрешения в плоскости XY. Создание более тонких срезов затруднено из-за параметров оборудования, характера образца и экономических ограничений. Для уменьшения величины шага между снимками можно применить метод интерполяции [1]. Поскольку томографические изображения представляют собой послойные изображения внутренней структуры объекта, для их улучшения мы можем использовать нейронную сеть, предназначенную для интерполяции видеокадров. В данном случае интерполяция необходима для усреднения размеров вокселей для построения однородной трехмерной модели.

В данной работе исследовалось решение задачи интерполяции стенок левого предсердия, сегментированных с МРТ грудной клетки. Основной целью является преобразование исходных МРТ-изображений в объемную модель стенки левого предсердия с одинаковым пространственным разрешением по осям X, Y и Z. Стоит отметить, что аналогичный подход, применение нейросети RIFE в таких целях, ранее был успешно применен для интерполяции МРТ-изображений головного мозга [1]. В данной работе получено аналогичное решение задачи интерполяции для МРТ сердца (стенка левого предсердия) независимо от авторов исследования [1]. Для оценки точности было применено два подхода: восстановление «промежуточных» изображений в стеке МРТ-изображений (коэффициент DICE = 0,89), а также проверка функциональности полученных 3D-моделей на референсном датасете с МРТ максимального качества [2] — более 9 Тесла на фиксированных извлеченных сердцах.

Для функциональных тестов полученных 3D-моделей проводилась симуляция проведения волны возбуждения по стенке левого предсердия; решение соответствующих дифференциальных уравнений выполнялось в среде OpenCarp (открытом симуляторе сердечной электрофизиологии для виртуальных экспериментов).

* Исследование выполнено за счет гранта Московского центра инновационных технологий в здравоохранении (соглашение № 1208-7).

© В. О. Карнаухова, М. М. Слотвицкий, А. П. Синицына, В. А. Цвелая, 2025

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы. Решена задача интерполяции МРТ-изображений стенки левого предсердия при помощи алгоритма RIFE; точность решения составляет 89 %, что может значительно ускорить процесс ручной разметки, а также позволяет проводить точные электрофизиологический симуляции на 3D-моделях с изотропными вокселями.

Литература

1. Gambini L., Gabbett C., Doolan L. et al. Video frame interpolation neural network for 3D tomography across different length scales // Nature Communications. 2024. Vol. 15, No. 1. P. 7962. URL: https://www.nature.com/articles/s41467-024-52260-2.

2. Roney C., Bendikas R., Pashakhanloo F. et al. Constructing a human atrial fibre atlas // Zenodo. 2020. URL: https://zenodo.org/records/3764917.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-331

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКСИНИКОТИНОИЛГЛУТАМАТА КАЛЬЦИЯ НА МОДЕЛЬ НАРУШЕНИЯ УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОГО ОБУЧЕНИЯ У КРЫС, ОБУСЛОВЛЕННОГО ХОЛИНЕРГИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ

THE EFFECT OF CALCIUM HYDROXYNICOTINOYL GLUTAMATE ON A MODEL OF IMPAIRED CONDITIONED REFLEX LEARNING IN RATS DUE TO CHOLINERGIC DEFICIENCY

А. В. Киселев[1], А. Л. Хохлов[2]

[1] *Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва*
[2] *Ярославский государственный медицинский университет*

A. V. Kiselev[1], A. L. Khokhlov[2]

[1] *N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS, Moscow*
[2] *Yaroslavl State Medical University*

✉ kiselevzagorsk@mail.ru

Аннотация

Изучены эффекты гидроксиникотиноилглутамата кальция в условиях холинергического дефицита, вызванного скополамином. При использовании сразу после окончания курса скополамина препарата гидроксиникотиноилглутамата кальция восстанавливается структура исследовательского поведения животных, происходит ослабление вызванных скополамином тревожных реакций.

Abstract

The effects of hydroxynicotinoyl glutamate calcium in conditions of cholinergic deficiency caused by scopolamine have been studied. When using immediately after the end of the course of scopolamine hydroxynicotinoyl glutamate calcium, the structure of the research behavior of animals is restored, the weakening of the anxiety reactions caused by scopolamine.

Болезнь Альцгеймера (БА) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое клинически выражается нарушением когнитивных функций с потерей памяти и способности к обучению. Также, несмотря на интенсивные попытки создания средств лечения БА на основе ингибиторов β- и γ-синтаз или ингибиторов агрегации амилоида, ни одно лекарственное средство до сих пор не прошло клинические испытания. Целью настоящей работы являлось изучение эффектов гидроксиникотиноилглутамата кальция на обусловленные холинергическим дефицитом поведенческие нарушения [1].

Для проведения работы были использованы 70 белых беспородных крыс самцов (вес 180–220 г, питомник «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Принципиальная схема эксперимента выглядит следующим образом. Крыс случайным образом разделяли на 4 группы. Животным группы 1 (n = 20) в течение 20 дней подряд (1 раз в сутки) вводили физиологический раствор (пассивный контроль), крысам 2, 3 и 4-й групп (n = 60) в течение 20 дней подряд (1 раз в сутки) вводили скополамин в дозе 1 мг/кг. С 21-го по 30-й день крысам группы 1 (пассивный контроль) и группы 2 (активный контроль) вводили физиологический раствор, а крысам экспериментальных групп 3 и 4 вводили, соответственно, гидроксиникотиноилглутамат кальция (40 мг/кг, 1 раз в день) или пирацетам (300 мг/кг, 1 раз в день). Вещества вводили внутрибрюшинно в концентрации 2 мл/100 г массы. Затем осуществляли поведенческие тесты, в которых оценивали ориентировочно-исследовательскую реакцию в тесте «открытое поле», тревожные реакции — в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» и способность к ассоциативному обучению — в тестах амнезии УРПИ и УРПИ в модификации двустороннего избегания электроболевого стимула.

Показано, что при тестировании животных в «открытом поле» у крыс с холинергическим дефицитом (группа активного контроля) отмечается снижение числа обследований отверстий в 2,2 раза по сравнению с крысами группы пассивного контроля, что свидетельствует о нарушении исследовательского поведения. Ампассе предупреждает развитие этих изменений, увеличивая число обследований отверстий до уровня показателей у группы пассивного контроля. Пирацетам в данном тесте не оказывает влияния на поведение крыс.

Введение скополамина вызывает существенное (в 10 раз) сокращение времени, проведенного крысами в «открытых» рукавах лабиринта, по сравнению животными группы пассивного контроля. При этом наблюдается общее снижение двигательной активности крыс. Комплекс этих изменений указывает на повышенную тревож-

© А. В. Киселев, А. Л. Хохлов, 2025

ность у животных с холинергическим дефицитом. Гидроксиникотиноилглутамат кальция проявляет корригирующий эффект, увеличивая время, проведенное животным в открытых рукавах (в 5 раз) и на центральной площадке (в 2 раза) по сравнению с группой активного контроля. Это свидетельствует о способности Ампассе ослаблять развитие повышенной тревожности под действием хронического введения скополамина в условиях «приподнятого крестообразного лабиринта» у крыс.

Литература

1. Киселев А. В., Стовбун С. В. Изучение антиалкогольного действия Ампассе на моделях неврологического и когнитивного дефицитов, вызываемых этанолом // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2022. Т. 85 (2). С. 43–48.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-332

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ МЫШИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ *XENOPUS LAEVIS* AGR *

STUDY OF WOUND HEALING PROCESSES IN MICE UNDER THE INFLUENCE OF *XENOPUS LAEVIS* AGR

А. В. Косых[1], Н. Г. Гурская[1,2], А. Г. Зарайский[1,2]

[1] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*
[2] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

A. V. Kosykh[1], N. G. Gurskaya[1,2], A. G. Zaraisky[1,2]

[1] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[2] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ avkosyh@gmail.com

Аннотация

Млекопитающие обладают весьма ограниченной способностью к восстановлению поврежденных тканей и органов, особенно в отношении полноценной репаративной регенерации. В работе показано, что в организме трансгенной мыши с индуцированной экспрессией фактора XAG (*Xenopus laevis* AGR) увеличивается скорость закрытия раны в процессе ранозаживления кожи, происходит усиление экспрессии коллагенов и некоторых металлопротеиназ.

Abstract

Mammals have a very limited ability to regenerate tissues and organs after injury, especially in the context of the full-fledged reparative regeneration. This work demonstrates that XAG (AGR from *Xenopus laevis)* increases the rate of wound closure in transgenic mice and stimulates collagen expression in the skin.

Кожа является первым барьером между организмом и внешней средой. У млекопитающих в постнатальный период развития повреждения кожи чаще всего приводят к образованию рубцовой ткани, сильно отличающейся от здоровой кожи. Существует множество подходов, направленных на увеличение эффективности заживления, улучшение функциональности, эластичности и чувствительности восстановленных тканей, — это терапия с использованием стволовых клеток, внеклеточных везикул и экзосом, местная аппликация факторов роста, пересадка биоинженерных конструктов и даже генотерапевтические препараты.

AGR (anterior gradient protein) относится к большому семейству эволюционно консервативных белков, активных в процессах регенерации у низших позвоночных, для которых характерно безрубцовое ранозаживление [1, 2]. У млекопитающих гомологичный белок (AGR2) экспрессируется в эмбриональной коже, тогда как у взрослых активность этого гена в норме подавлена и наблюдается только в слизистом эпителии пищеварительного тракта, способном к полной регенерации [3].

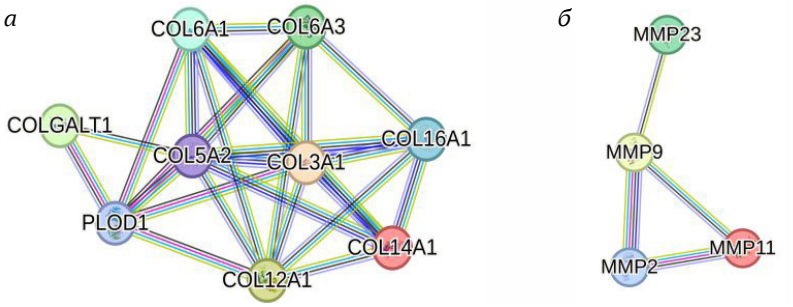
Анализ потенциала AGR как стимулятора регенерации оценивали на модели ранозаживления кожи трансгенной мыши с индуцированной экспрессией XAG (Xenopus laevis AGR). Размеры раны замеряли сразу после нанесения и далее через день до полного закрытия ран в контрольной и экспериментальных группах. Скорость закрытия раны оценивали по изменению площади раны, которая была оценена в процентах от первоначального размера нанесенной раны, принятого за 100 %. Среднее время закрытия раны в обеих группах составило 19 суток, однако было выявлено, что на 16-е сутки размер раны у XAG+-мышей был на 22 % меньше (p-value < 0,05) в сравнении с контрольными животными.

Задачей работы было провести транскриптомный анализ XAG+-мышей и мышей дикого типа для выявления генов, дифференциально экспрессирующихся в новообразованных тканях в процессе ранозаживления. Для этого были отобраны биоптаты новообразованных тканей, из которых выделили тотальную РНК. Секвенирование с глубиной от 13 до 20 млн ридов в каждом образце было выполнено в трех повторностях для обеих групп сравнения.

Биоинформатический анализ результатов секвенирования с помощью ресурсов GO, KEGG и STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)* позволил выявить несколько взаимосвязанных генных сетей и взаимодействий белков. Найдено несколько сотен дифференциальных генов, объединенных в такие био-

* Исследование выполнено при поддержке Министерства здравоохранения РФ (соглашение № 124021000001-9).
© А. В. Косых, Н. Г. Гурская, А. Г. Зарайский, 2025

логические процессы, как кальций-независимая клеточная адгезия, цитолиз, регуляция эпителиальной миграции, секреция и биогенез экзосом, регуляция активации нейтрофилов, морфогенез и регенерация сустава, катаболические процессы протеогликанов и дерматансульфата. Например, было обнаружено увеличение экспрессии генов, кодирующих различные субъединицы коллагенов, а также белков, ассоциированных с процессами его созревания, на фоне эндогенной экспрессии XAG, нормированной на показатели экспрессии мыши дикого типа (см. рисунок).



Сеть белок-белковых взаимодействий (построено с помощью алгоритма и базы данных STRING): *а* — кластер белков матрикса, кодируемых генами, обогащенными в новообразованных тканях XAG+-мышей; *б* — кластер металлопротеиназ матрикса, кодируемых генами с повышенной экспрессией в новообразованных тканях XAG+-мышей

Увеличенная экспрессия коллагенов (*COL6A1, COL12A1, COL14A1* и *PLOD1*), которые обеспечивают структурную и функциональную целостность внеклеточного матрикса и сохранение его нормальной архитектуры, в сочетании с повышенной экспрессией некоторых металлопротеиназ (*MMP2, MMP9, MMP11*), ремоделирующих матрикс и также меняющих его механические свойства, является частью специфической сети взаимосвязей, отличающей транскриптомы XAG+-мышей от транскриптомов мышей дикого типа с тем же генетическим фоном (см. рисунок). Особо стоит отметить *COL3A1*, повышенная экспрессия которого в эмбриогенезе ассоциируется с процессами безрубцового заживления [4].

Таким образом, XAG представляется нам перспективным агентом для изучения возможностей стимуляции регенеративных процессов у млекопитающих.

Литература

1. Ivanova A. S., Tereshina M. B., Ermakova G. V. et al. Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles // Scientific Reports. 2013. Vol. 3. P. 1279.

2. Ivanova A. S., Tereshina M. B., Araslanova K. R. et al. The secreted protein disulfide isomerase Ag1, lost by ancestors of poorly regenerating vertebrates, is required for Xenopus laevis tail regeneration // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. Vol. 9. P. 738940.

3. Kosykh A. V., Tereshina M. B., Gurskaya N. G. Potential role of AGR2 for mammalian skin wound healing // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, No. 9. P. 7895.

4. Stewart D. C., Brisson B. K., Yen W. K. et al. Type III collagen regulates matrix architecture and mechanosensing during wound healing // The Journal of Investigative Dermatology. 2025. Vol. 145, No. 4. P. 919–938.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-333

ОСОБЕННОСТИ РОСТА НЕЙРОНОВ НА ПОЛИДИМЕТИЛСИЛОКСАНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ *

CHARACTERISTICS OF NEURONAL GROWTH ON PDMS SUBSTRATE

С. В. Кравченко, К. А. Арсентьев, С. П. Коновалова

Научно-технологический университет «Сириус», Сочи

S. V. Kravchenko, K. A. Arsentiev, S. P. Konovalova

Sirius University of Science and Technology, Sochi

✉ kravchenko.sv@talantiuspeh.ru

Аннотация

В данной работе проведен анализ особенностей роста первичной культуры нейронов мозжечка мыши на поверхности полидиметилсилоксановой (PDMS) подложки, покрытой поли-L-лизином. Результаты показали, что нейроны на PDMS формируют трехмерные сфероиды, тогда как на классическом полистироле создают монослой. Отличия в клеточном поведении связываются с меньшей адгезией поли-L-лизина к гидрофобному PDMS и его механическими свойствами.

Abstract

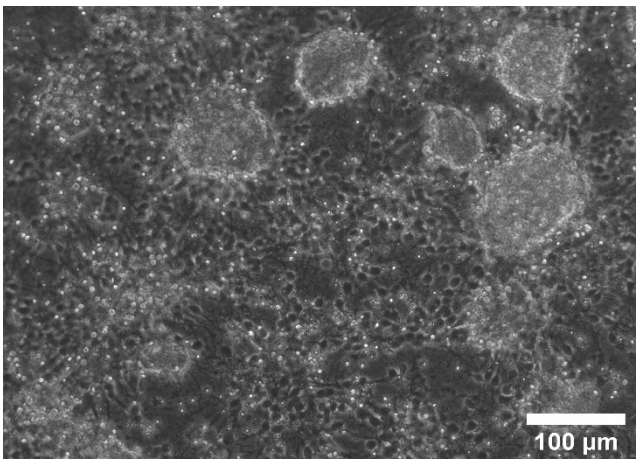
This study analyzes the growth characteristics of a primary culture of mouse cerebellar neurons on a polydimethylsiloxane (PDMS) substrate coated with poly-L-lysine. The results demonstrate that neurons on PDMS form three-dimensional spheroids, whereas on conventional polystyrene, they develop a monolayer. The differences in cellular behavior are attributed to the weaker adhesion of poly-L-lysine to hydrophobic PDMS and its mechanical properties.

Одним из ключевых факторов, влияющих на морфологию, выживаемость и функциональную активность нейронов в культуре, являются физико-химические свойства субстрата, на котором они растут. Традиционно в качестве основы для клеточных культур используется культуральный пластик полистирол, обладающий высокой жесткостью, что слабо имитирует механические свойства нервной ткани, для которой характерна величина модуля Юнга 100 Па — 10 кПа [1], в то время как у полистирола данное значение достигает 3 ГПа [2]. Полидиметилсилоксан (PDMS), активно применяемый в сфере микрофлюидики и систем «орган-на-чипе», а также при изготовлении гибких электродных матриц нейропротезов, отличается высокой эластичностью, хорошей проницаемостью для кислорода, биосовместимостью и низкой токсичностью. Его величина модуля Юнга составляет 0,5–2 МПа [3], что, хоть и все еще выше, чем у нервной ткани, существенно ниже, чем у полистирола.

Актуальность изучения культивирования нейронов на PDMS обусловлена необходимостью создания более физиологически релевантных *in vitro* моделей нейрональных сетей. Кроме того, анализ взаимодействия нервных клеток с PDMS может иметь важное значение для понимания процессов интеграции имплантируемых в структуры нервной системы устройств из данного материала.

Целью данной работы явился анализ характера роста первичной культуры клеток-зерен мозжечка мыши на полидиметилсилоксановой подложке.

Использовался коммерческий PDMS Редалид 184 — аналог Dow Corning Sylgard 184. Выполнялось смешивание основы с отвердителем в объемном соотношении 10 : 1, после чего смесь дегазировалась в вакуумном шкафу. По 0,2 мл жидкого PDMS наносилось на дно лунок двух 24-луночных культуральных планшетов. 8 лунок в каждом план-



Микрофотография клеток-зерен мозжечка мыши на 4-е сутки культивирования на поверхности PDMS

* Исследование выполнено при поддержке государственной программы «Научно-технологическое развитие федеральной территории „Сириус“» (соглашение № 18-03 от 10.09.2024, проект № NRB-BFT-2406).

© С. В. Кравченко, К. А. Арсентьев, С. П. Коновалова, 2025

шете не покрывались PDMS и использовались в качестве контроля. После отверждения PDMS в течение 48 ч проводилась 60-минутная стерилизация УФ-излучением и покрытие поли-L-лизином.

Диссоциированные клетки-зерна мозжечка 5-дневных мышей вносились дозатором в лунки контроля и в лунки, покрытые PDMS. Для культивирования использовалась Нейробазальная среда, с добавлением НейроМакс (B27), L-глутамина, добавки N2. На 4-й день проводилась микроскопия с использованием фазового контраста.

В контроле нейроны, росшие на обычном культуральном пластике, покрытом поли-L-лизином, образовывали монослой. Наблюдались тела и отростки нервных клеток. Нейроны, росшие на поверхности PDMS, образовывали сфероиды диаметром 70–100 мкм (см. рисунок).

При этом между сфероидами на поверхности PDMS также наблюдался монослой клеток, образованный телами нейронов и их отростками. Вероятной причиной наблюдаемых различий в росте нейронов на полистироле и PDMS может являться слабая адгезия поли-L-лизина к PDMS, что осложняет прикрепление клеток к субстрату, из-за чего происходит их агрегация.

Хотя PDMS в силу своей гидрофобности сложнее поддается покрытию поли-L-лизином, что может затруднять адгезию клеток, его механические свойства, в сравнении со стандартным культуральным пластиком, ближе к таковым у нервной ткани. Дальнейшие исследования могут быть направлены на модификацию поверхности PDMS для улучшения его адгезивных свойств и улучшения способности поддерживать жизнеспособность нейронов в культуре.

Литература

1. Woods G. A., Rommelfanger N. J., Hong G. Bioinspired materials for in vivo bioelectronic neural interfaces // Matter. 2020. Vol. 3, No. 4. P. 1087–1113.

2. Wyle Y., Lu N., Hepfer J. et al. The role of biophysical factors in organ development: insights from current organoid models // Bioengineering. 2024. Vol. 11, No. 6. P. 619.

3. Zhang Q. Y., Zhang Y. Y., Xie J. et al. Stiff substrates enhance cultured neuronal network activity // Scientific Reports. 2014. Vol. 4, No. 1. P. 6215.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-334

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОК В ХАНТЫ-МАНСИЙСКОМ АВТОНОМНОМ ОКРУГЕ — ЮГРЕ *

NEXT-GENERATION SEQUENCING IN DIAGNOSTICS OF HEREDITARY BREAST CANCER: STUDY OF THE SPECTRUM OF MUTATIONS IN PATIENTS IN THE KHANTY-MANSIYSK AUTONOMOUS OKRUG — YUGRA

Ю. Д. Крайнова[1], А. В. Морозкина[1], М. Ю. Донников[1], Э. М. Магомедова[2], Л. В. Коваленко[1]

[1] *Сургутский государственный университет*
[2] *Сургутская окружная клиническая больница*

Yu. D. Kraynova[1], A. V. Morozkina[1], M. Yu. Donnikov[1], E. M. Magomedova[2], L. V. Kovalenko[1]

[1] *Surgut State University*
[2] *Surgut Regional Clinical Hospital*

✉ yulyakraynova1908@mail.ru

Аннотация

Работа посвящена изучению распространения патогенных мутаций, ассоциированных с наследственным раком молочной железы, у пациенток в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре. Впервые в округе использован метод высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS), позволивший выявить 17 мутаций у 32 пациенток в генах *BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2*. Наибольшей частотой обладали мутации c.5263_5264insC в гене *BRCA1* и c.2808_2811delACAA в гене *BRCA2*.

Abstract

The work is devoted to the study of the spread of pathogenic mutations associated with hereditary breast cancer among patients in the Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug — Yugra. The method new generation high-throughput sequencing (NGS) was used, which made it possible to identify 17 mutations in 32 patients in the *BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2* genes. Mutations c.5263_5264insC in the *BRCA1* gene and c.2808_2811delACAA in the *BRCA2* gene had the highest frequency.

Рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным у женщин, и в последние годы увеличилось число молодых пациенток. Исследования подтверждают значительный вклад мутаций в его развитии: наследственные формы составляют до 10 % от всех случаев. Наиболее часто это связано с мутациями в генах *BRCA1, BRCA2, CHEK2, NBS1, BLM, TP53* и др. [1]. Опубликованные данные о частоте носительства мутаций у женщин в ХМАО-Югре носят фрагментарный характер [2]. Использование секвенирования нового поколения (NGS) снижает затраты на неэффективное лечение за счет таргетного подхода и позволяет выявлять мутации, недоступные для ПЦР-скрининга.

Цель работы — выявление патогенных вариантов (мутаций), ассоциированных с наследственными формами РМЖ, у пациенток, постоянно проживающих в ХМАО-Югре и проходивших лечение в онкологическом отделении Сургутской окружной клинической больницы.

В исследовании приняли участие 273 женщины в возрасте от 18 до 79 лет, средний возраст составил 50,5 ± 9,25 года. Мутации выявлялись методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) с использованием набора «HELICON ABC Плюс» (ОнкоАтлас, Россия) на секвенаторе DNBSEQ G50RS (MGI, KHP). Анализ данных и интерпретация результатов выполнены с помощью ПО Solo AVES (ОнкоАтлас, Россия).

Результаты исследования: у 32 пациенток было выявлено 17 мутаций в генах *BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2* (см. таблицу).

В гене *BRCA1* мутации зарегистрированы у 19 больных, наиболее часто встречающаяся мутация c.5263_5264insC (5382insC) выявлена у 11 женщин (частота 0,579); мутация c.3143delG зарегистрирована у 2 женщин (частота 0,105). Остальные 6 мутаций выявлены однократно. В гене *BRCA2* мутации зарегистрированы у 9 женщин, наиболее частая мутация c.2808_2811delACAA (0,333) выявлена у 3 пациенток. В гене *CHEK2*

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-574-05.

© Ю. Д. Крайнова, А. В. Морозкина, М. Ю. Донников, Э. М. Магомедова, Л. В. Коваленко, 2025

выявлены две мутации: c.444+1G>A у 2 женщин и c.470T>C у 1 женщины. В гене *PALB2* однократно выявлена мутация c.1342delA.

Характеристика и частота выявленных мутаций

HGVS cDNA	HGVS белок	dbSNP (rs)	Тип	Клин. знач.	Кол-во	Частота мутации
BRCA1						
c.5263_5264insC	p.Gln1756Profs	rs80357906	fs	P	11	0,578
c.3143delG	p.Gly1048fs	rs886040100	fs	P	2	0,105
c.181T>G	p.Cys61Gly	rs28897672	миссенс	P	1	0,053
c.1961delA	p.Lys654Serfs	rs80357522	fs	P	1	0,053
c.3607C>T	p.Arg1203Ter	rs62625308	миссенс	P	1	0,053
c.4035_4035delA	p.Glu1345 = fs	rs80357711	fs	P	1	0,053
c.5143A>C	p.Ser1715Arg	rs80357222	миссенс	P	1	0,053
c.5251C>T	p.Arg1751Ter	rs80357123	миссенс	P	1	0,053
BRCA2						
c.2808_2811delACAA	p.Ala938Profs	rs80359351	fs	P	3	0,333
c.3975_3978dupTGCT	p.Ala1327fs	rs397515636	fs	P	2	0,222
c.1813dupA	p.Ile605Asnfs	rs80359306	fs	P	1	0,111
c.2446delG	p.Glu816fs	rs80359330	fs	P	1	0,111
c.5351dupA	p.Asn1784fs	rs80359507	fs	P	1	0,111
c.6591_6592delTG	p.Glu2198fs	rs80359605	fs	P	1	0,111
CHEK2						
c.444+1G>A	–	rs121908698	SNV в интроне	P	2	0,667
c.470T>C	p.I157T	rs17879961	миссенс	P	1	0,333
PALB2						
c.1342delA	p.S448fs	rs2506480988	fs	P	1	–

Примечание: * — компаунд-гетерозигота; P — патогенный вариант; LP — вероятно патогенный; fs — frameshift (сдвиг рамки); del — делеция.

Таким образом, метод NGS демонстрирует высокую чувствительность при выявлении редких мутаций, что играет ключевую роль в диагностике наследственных форм РМЖ, позволяя выявлять весь спектр мутаций, включая редкие и этнически специфичные варианты, недоступные для ПЦР-скрининга, что обеспечивает персонализацию терапии (например, назначение PARP-ингибиторов) и своевременную профилактику у ближайших родственников пациенток с РМЖ.

Литература

1. Николаева Т. И., Филиппов Э. В., Того А. В. и др. Эффективность использования ПЦР и NGS тестирования при раке молочной железы у женщин, проживающих в Якутии // Вопросы онкологии. 2025. Т. 71, № 1. С. 91–99.

2. Захарова Н. А., Донников М. В., Филимонов А. В. Анализ мутаций в генах BRCA1/2 и CHEK2 на биологических микрочипах в рамках скрининговой программы по ранней диагностике рака молочной железы в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре // Вестник новых медицинских технологий. 2011. № 3. С. 67–69.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-335

ОСТЕОПОРОЗ: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ И АДРЕНАЛИН-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА

OSTEOPOROSIS: GENETIC PREDISPOSITION AND EPINEPHRINE-DEPENDENT MECHANISMS OF IMPAIRED OSTEOGENESIS

О. А. Краснова, П. И. Семенова, Ю. В. Сопова, И. Э. Неганова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

O. A. Krasnova, P. I. Semenova, J. V. Sopova, I. E. Neganova

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ o.krasnova@incras.ru

Аннотация

Настоящее исследование выявило генотип-зависимое влияние адреналина на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток (МСК), специфичных для пациентов. В клетках с аллелью A/A полиморфизма rs1042713 гена *ADRB2* было выявлено значительное снижение минерализации при добавлении адреналина в остеоиндукционную среду, тогда как у клеток с G/G-генотипом наблюдалось минимальное подавление дифференцировки в тех же условиях.

Abstract

The present study revealed a genotype-dependent effect of epinephrine on the osteogenic differentiation of osteoporotic patient-derived mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs carrying the A/A allele of the rs1042713 polymorphism in the *ADRB2* gene, showed a significant two-fold reduction in Alizarin Red staining, whereas the G/G genotype demonstrated minimal negative impact on osteogenic differentiation.

Остеопороз — тяжелое метаболическое заболевание костной ткани (КТ), характеризующееся снижением ее минеральной плотности, нарушением микроархитектоники КТ и повышенным риском низкоэнергетических переломов. Ввиду бессимптомного течения на ранних стадиях заболевание часто диагностируется только после первого перелома, что значительно ограничивает эффективность терапии. Особую актуальность эта проблема приобретает у пациентов с коморбидными патологиями, включая эндокринные и сердечно-сосудистые нарушения, которые могут усугублять течение остеопороза [1].

В связи с этим особое значение приобретает поиск надежных прогностических маркеров, позволяющих выявлять лиц с повышенным риском развития остеопороза до манифестации клинических проявлений. Одним из перспективных направлений является исследование генетических факторов, в частности однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах, регулирующих гомеостаз костной ткани.

Особый интерес представляет полиморфизм rs1042713 (Gly16Arg) в гене β2-адренорецептора (*ADRB2*), который может влиять на процессы остеогенеза. Данный SNP является функциональным и приводит к изменению внутриклеточного ответа в зависимости от аллельного варианта [2]. Предполагается, что его роль может быть особенно значимой у пациентов с состояниями, сопровождающимися гиперадреналемией. Однако существующие данные об ассоциации этого полиморфизма с риском остеопороза остаются противоречивыми, что требует дальнейших исследований с применением пациент-специфичных клеточных линий, в том числе в условиях активации рецептора его естественным агонистом — адреналином.

Цель исследования — изучить влияние полиморфизма rs1042713 (Gly16Arg) гена *ADRB2* на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток от пациентов с остеопорозом в присутствии адреналина.

Материалы и методы

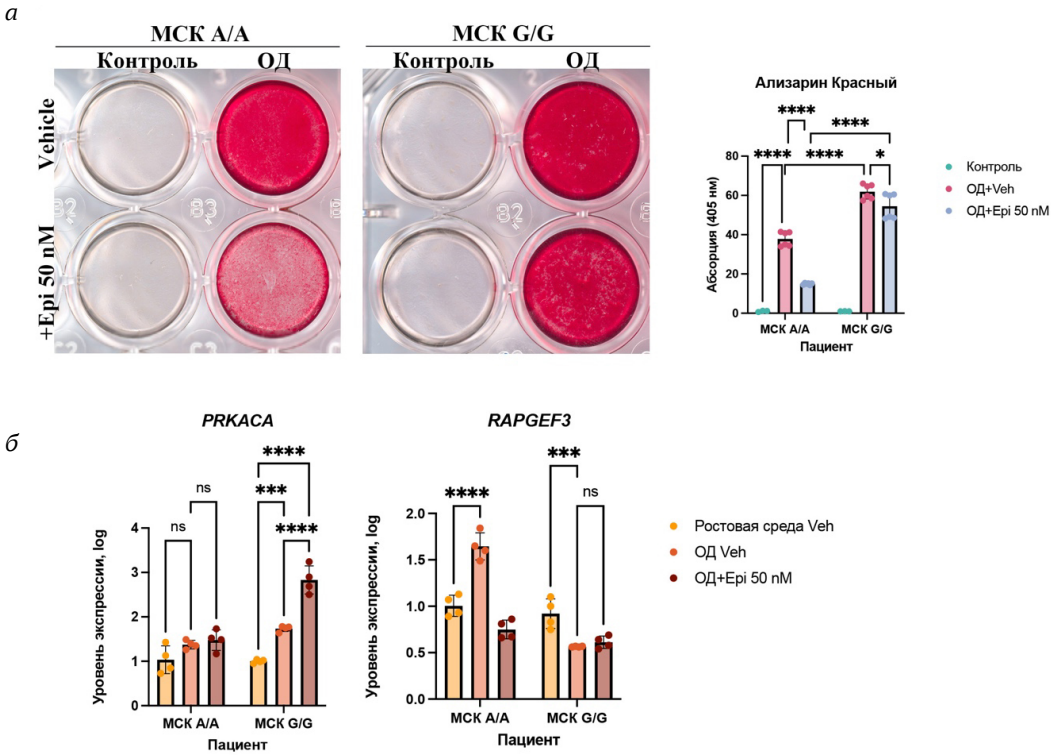
Были получены пациент-специфичные мезенхимные стволовые клетки (МСК) с аллельными вариантами A/A (n = 3) и G/G (n = 3) из костных биопсий пациентов, проходивших хирургическое лечение в НМИЦ травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена, Санкт-Петербург. Эффективность остеогенной дифференцировки оценивали при культивировании клеток в остеоиндукционной среде с добавлением 50 нМ адреналина, используя окрашивание ализариновым красным для качественного и количественного анализа минерализации матрикса. Дополнительно методом ПЦР в реальном времени анализировали экспрессию генов *PRKACA* (кодирует проте-

© О. А. Краснова, П. И. Семенова, Ю. В. Сопова, И. Э. Неганова, 2025

инкиназу А — ключевую мишень β2-адренорецептора) и *RAPGEF3* (кодирует белок EPAC1 — альтернативный сигнальный медиатор).

Результаты

Впервые показано, что степень негативного влияния адреналина на остеогенную дифференцировку зависит от генотипа по полиморфизму rs1042713. МСК с генотипом A/A демонстрировали более чем двукратное снижение минерализации при добавлении адреналина, в то время как в клетках G/G это снижение не превышало 10 % (см. рисунок, *а*). Анализ экспрессии генов выявил генотип-зависимые различия: в клетках G/G наблюдалось усиление экспрессии *PRKACA* (PKA) как при остеогенной дифференцировке, так и при добавлении адреналина, тогда как в клетках A/A уровень экспрессии этого гена оставался неизменным. Примечательно, что в клетках A/A при дифференцировке усиливалась экспрессия *RAPGEF3* (EPAC1) (см. рисунок, *б*).



Генотип-зависимые различия в ответе на адреналин: *а* — оценка способности минерализации синтезируемого матрикса с помощью окрашивания ализариновым красным; *б* — анализ экспрессии генов, вовлеченных в сигнальные пути β2-адренорецептора. Сокращения: ОД — остеогенная дифференцировка; Veh — vehicle, Epi — epinephrine (адреналин); * — $p > 0{,}05$, *** — $p > 0{,}001$, **** — $p > 0{,}0001$, ns — not significant, статистически незначимо

Таким образом, полученные результаты предполагают, что чувствительность МСК к действию адреналина генетически детерминирована: в клетках A/A при добавлении адреналина снижается эффективность остеогенной дифференцировки, тогда как клетки G/G сохраняют способность к дифференцировке.

Литература

1. Liang B., Burley G., Lin S., Shi Y.-C. Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues // Cellular & Molecular Biology Letters. 2022. Vol. 27, No. 1. P. 72.

2. Kondrashov A., Mohd Yusof N. A. N., Hasan A. et al. CRISPR/Cas9-mediated generation and analysis of N-terminus polymorphic models of β_2-AR in isogenic hPSC-derived cardiomyocytes // Molecular Therapy Methods & Clinical Development. 2021. Vol. 20. P. 39–53.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-336

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСТЕОГЕННЫХ СВОЙСТВ PCL-МАТРИЦ С ИОННЫМИ ПОКРЫТИЯМИ (CA^{2+}/MG^{2+}) И BMP-2: *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЕ *

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE OSTEOGENIC PROPERTIES OF PCL MATRICES WITH IONIC COATINGS (CA^{2+}/MG^{2+}) AND BMP-2: AN *IN VITRO* STUDY

К. И. Куркова[1], Д. В. Риппинен[1], Д. В. Дейнеко[2], М. А. Гольдберг[3], А. О. Соловьева[1]

[1]*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*
[2]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3]*Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова РАН, Москва*

K. I. Kurkova[1], D. V. Rippinen[1], D. V. Deyneko[2], M. A. Goldberg[3], A. O. Solovyova[1]

[1]*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Lomonosov Moscow State University*
[3]*Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science RAS, Moscow*

✉ kurkova_kristina2000@mail.ru

Аннотация

В работе проведен сравнительный анализ влияния различных методов химической модификации поверхности поликапролактона (PCL) на пролиферативную активность остеобластов (ОСБ) *in vitro*.

Abstract

The work presents a comparative analysis of the effect of different methods of chemical modification of the surface of polycaprolactone (PCL) on the proliferative activity of osteoblasts (OSB) *in vitro*.

Одной из основных проблем современной регенеративной медицины является возрастающая потребность в функциональных костных трансплантатах для клинического применения [1]. В связи с этим в последнее время особое внимание исследователей направлено на разработку новых биомиметических материалов, способных воспроизводить ключевые характеристики естественной костной ткани и стимулировать процессы остеорегенерации.

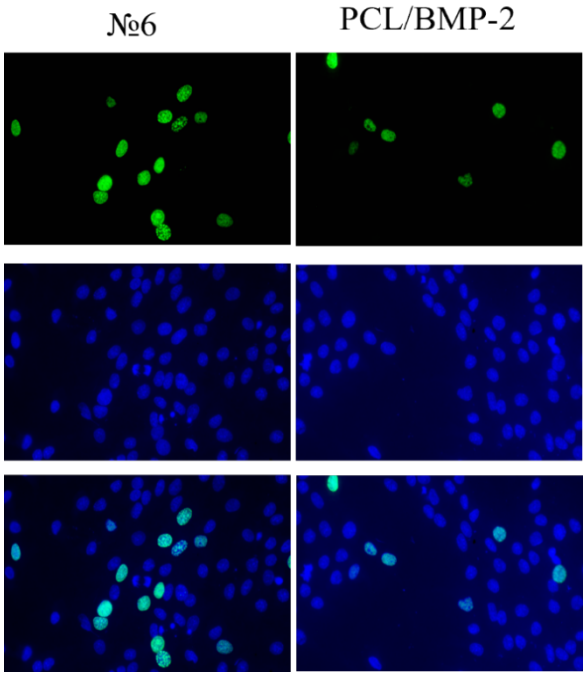
Кальций и магний — два важнейших минерала для формирования костной ткани. Кальций служит основным строительным элементом гидроксиапатита — главного минерала костей, а магний регулирует процесс его кристаллизации, влияя на структуру и свойства кости [2, 3]. Химическая модификация поверхностей путем иммерсии в раствор гидрофосфат аммония ($(NH_4)_2HPO_4$) с последующим переносом в растворы нитрата кальция ($Ca(NO_3)_2$) и нитрата магния ($Mg(NO_3)_2$) может приводит к улучшению механических характеристик материала и повышению адгезии и пролиферации остеогенных клеток.

Для изучения влияния поверхностного покрытия на биологические свойства ОСБ в работе использованы химически модифицированные поверхности волокон поликапролактона (PCL), полученные при помощи электроформования, с нанесенными биоактивными фосфатами $Ca_3(PO_4)_2$, $Ca_{1.5}Mg_{1.5}(PO_4)_2$ и $Mg_3(PO_4)_2$ прямым (№ 1 Ca^{2+} — прямой, № 2 Ca^{2+} Mg^{2+} — прямой, № 3 Mg^{2+} — прямой) и обратным (№ 4 Ca^{2+} — обратный, № 5 Ca^{2+} Mg^{2+} — обратный, № 6 Mg^{2+} — обратный) методами осаждения. В качестве контрольной группы использовались поверхности PCL, функционализированные путем иммерсионного нанесения костного мофогенетического белка — 2 (BMP-2), обладающего выраженным остеоиндуктивным потенциалом.

В качестве объекта исследования использовалась первичная линия остеобластов человека, выделенная из культуры (исследование одобрено этическим комитетом НИИКЭЛ, протокол от 11.08.2023 № 183). Самое высокое количество клеток (179 ± 31) и их пролиферативная активность (13 ± 3 %) наблюдалась на материале № 6 Mg^{2+} — обратный, тогда как на контрольном материале их значения были ниже (165 ± 1 клетка и 8 ± 2 %; $p \leqslant 0{,}05$) (см. рисунок). Также было показано, что спустя 7 дней инкубации количество клеток на материале № 6 Mg^{2+} — обратный увеличилось в 2 раза (373 ± 28), в то время как на контрольном материале их количество возросло незначительно (172 ± 8; $p \leqslant 0{,}05$).

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FWNR-2022-0009).

© К. И. Куркова, Д. В. Риппинен, Д. В. Дейнеко, М. А. Гольдберг, А. О. Соловьева, 2025



Репрезентативные фотографии клеток, полученных при помощи флюоресцентной микроскопии на материалах № 6 Mg^{2+} — обратный и PCL/BMP-2 при увеличении 40×. *Синий* — EdU (окрашивает ядра пролиферирующих клеток), *зеленый* — Hoechst (окрашивает ядра всех клеток)

Результаты эксперимента продемонстрировали, что материал с ионами магния (№ 6 Mg^{2+} — обратный) проявлял наибольшую эффективность, в сравнении как с кальцийсодержащими аналогами, так и с контрольной группой с BMP-2. Предложенная методика может стать альтернативой использования BMP-2 при создании материалов, обладающих остеоиндуктивным потенциалом, устраняя риски гиперстимуляции и снижая стоимость материалов.

Литература

1. Wu A. M. et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2 Newton: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019 // The Lancet Healthy Longevity. 2021. Vol. 2, No. 9. P. e580–e592.

2. Ciosek Ż. et al. The effects of calcium, magnesium, phosphorus, fluoride, and lead on bone tissue // Biomolecules. 2021. Vol. 11, No. 4. P. 506.

3. Gavazzo P. et al. Biophysical phenotyping of mesenchymal stem cells along the osteogenic differentiation pathway // Cell Biology and Toxicology. 2021. Vol. 37, No. 6. P. 915–933.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-337

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАРУШЕНИЙ В РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ ТОНКОЙ НИТИ, ВЫЗВАННЫХ МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *TPM1* *

BIOCHEMICAL ASPECTS OF THIN FILAMENT DYSFUNCTIONS CAUSED BY MUTATIONS IN THE *TPM1* GENE

К. К. Лапшина[1,2], В. В. Нефёдова[2]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*

K. K. Lapshina[1,2], V. V. Nefedova[2]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow*

✉ lapshina.2003@gmail.com

Аннотация

В работе исследовано влияние замен L57P, I92M и E97Q на свойства сердечного тропомиозина Tpm1.1. L57P приводила к изменениям в структуре Tpm, снижала его сродство к F-актину и увеличивала чувствительность тонких нитей к Ca^{2+}. I92M и E97Q изменяли регуляторную функцию тонкого филамента, без выраженных изменений структуры. Полученные эффекты могут коррелировать с развитием патогенного фенотипа.

Abstract

The effect of mutations L57P, I92M and E97Q on the functions of cardiac tropomyosin Tpm1.1 was investigated. L57P led to changes in the structure of Tpm, reduced its affinity for F-actin, and increased the sensitivity of thin filaments to Ca^{2+}. I92M and E97Q changed the regulatory function of the thin filament, without significant structural changes. The effects obtained may correlate with the development of a pathogenic phenotype.

Кардиомиопатии — это заболевания миокарда, ведущие к нарушению его сократительной функции. Самыми распространенными типами такой патологии являются дилатационная и гипертрофическая кардиомиопатии. Одним из возможных молекулярных механизмов развития заболевания считаются точечные мутации в гене *TPM1*, кодирующем сердечную изоформу тропомиозина Tpm1.1. Этот *coiled-coil* белок связывается с фибриллярным актином (F-актином) и играет ключевую роль в Ca^{2+}-зависимой регуляции мышечного сокращения. Структурные дефекты Tpm1.1 способны дестабилизировать тонкую нить, нарушая работу сократительного аппарата.

В работе были проанализированы новые мутации в гене *TPM1*, приводящие к заменам L57P, I92M и E97Q, упомянутые в базе *ClinVar* как варианты с неопределенной патогенностью. I92M и L57P затрагивают положение суперспирали, критически важное для стабилизации гидрофобного кора. Согласно данным *ClinVar*, I92M может быть связана с дилатационной, а L57P — с гипертрофической кардиомиопатией.

Функциональные последствия мутаций оценивали в искусственной подвижной системе (ИПС), включающей F-актин, сердечный миозин и Tpm, а также тропониновый комплекс (Tn), который связывает ионы Ca^{2+}. Было установлено, что замена L57P увеличивает чувствительность к Ca^{2+} и повышает максимальную скорость движения тонких нитей, что может свидетельствовать о гипертрофическом фенотипе и нарушении расслабления сердечной мышцы. В случае мутации E97Q чувствительность к Ca^{2+} также возрастала, но скорость нитей оставалась на уровне контрольного препарата; при этом движение не прекращалось даже при низкой концентрации Ca^{2+}. Напротив, для I92M скорость скольжения существенно снижалась, несмотря на нормальную чувствительность, а реакция на изменение концентрации Ca^{2+} была замедлена.

Для выяснение молекулярных основ выявленных эффектов были проведены биохимические исследования. Аффинность мутантов к F-актину оценивали методом соосаждения. Константы полунасыщения актиновых филаментов ($K_{50\,\%}$) вариантами Tpm1.1 I92M и E97Q не отличались от дикого типа (WT) (1,71 ± 0,13 мкМ), тогда как Tpm1.1 L57P обеспечивал лишь 25 % насыщения при тех же условиях. Это указывает на существенное снижение сродства к F-актину и может приводить к нарушению регуляторной функции.

Анализ стабильности комплекса Tpm — F-актин показал, что L57P диссоциирует при 36 °C — температуре, совпадающей с физиологической. Остальные варианты сохраняли стабильность, сравнимую с WT. По дан-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00059-П).
© К. К. Лапшина, В. В. Нефёдова, 2025

ным дифференциальной сканирующей калориметрии, у варианта L57P исчезает высокотемпературный калориметрический домен (участок молекулы, денатурирующий независимо от других), что указывает на серьезные изменения в структуре молекулы.

Вариант L57P, проявивший наибольшие структурно-функциональные изменения относительно Tpm WT, был подвергнут ограниченному протеолизу трипсином. Помимо сайта расщепления в районе центрального Arg133 (длина Tpm1.1 составляет 284 а. о.), характерного для WT, у L57P были идентифицированы и другие участки, находящиеся в N-концевой части молекулы. Это указывает на локальное нарушение упаковки *coiled-coil* и повышенную подвижность ранее плотно упакованных участков, что может также ослаблять взаимодействие Tpm с F-актином.

С учетом влияния Tn на поведение Tpm в ИПС дополнительно протестировали фрагмент тропонина Т TnT_{1-158} на способность стабилизировать комплекс Tpm1.1 L57P — F-актин. Температура диссоциации трехкомпонентных комплексов повышалась, но оставалась ниже таковой в комплексе с WT, что указывает на ограниченные компенсаторные возможности TnT.

Полученные данные указывают на то, что точечные замены в Tpm1.1 по-разному влияют на его структуру, стабильность и регуляторные свойства. Варианты I92M и E97Q влияли на подвижность тонких нитей, но для них не было выявлено прочих структурно-функциональных изменений. Напротив, структурно-функциональные эффекты замены L57P были обнаружены во всех проведенных экспериментах. Данная мутация потенциально способна нарушать расслабление сердечной мышцы и способствовать развитию гипертрофической кардиомиопатии. Использованные *in vitro* подходы позволяют на молекулярном уровне оценивать функциональные последствия клинически значимых замен и могут служить основой для разработки целевых терапевтических стратегий.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-338

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ МРНК-ВАКЦИНЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕН ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА A/H5N8 *

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF AN MRNA VACCINE ENCODING THE HEMAGGLUTININ GENE OF THE HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE A/H5N8

В. Р. Литвинова, Н. Б. Рудометова, В. А. Яковлев, Е. В. Тигеева, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, А. П. Рудометов

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

V. R. Litvinova, N. B. Rudometova, V. A. Yakovlev, E. V. Tigeeva, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, D. N. Kisakov, L. I. Karpenko, A. P. Rudometov

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

✉ viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

Аннотация

В связи с пандемическим потенциалом высокопатогенного вируса гриппа подтипа A/H5 и растущим числом случаев заражения млекопитающих необходима разработка эффективной вакцины. В данной работе была получена мРНК-вакцина, кодирующая гемагглютинин высокопатогенного вируса гриппа подтипа A/H5N8, и исследованы ее иммуногенные свойства на мышах линии BALB/c при доставке с помощью струйной инжекции.

Abstract

Due to the pandemic potential of highly pathogenic influenza A/H5 virus and the increasing number of mammalian infections, it is necessary to develop an effective vaccine. In this study, an mRNA vaccine encoding the hemagglutinin of highly pathogenic influenza A/H5N8 virus was obtained and its immunogenic properties were investigated in BALB/c mice when delivered by jet injection.

Высокопатогенные вирусы птичьего гриппа (HPAI) подтипа A/H5 вызывают вспышки заболевания среди диких и домашних птиц, а также заражают человека и различных диких и домашних млекопитающих, включая крупный рогатый скот, свиней, кошек, хорьков, морских львов и др. [1]. По состоянию на 1 июля 2025 г. зафиксировано 986 случаев заражения людей вирусом гриппа A/H5N1, из которых 473 случая закончились смертельным исходом. Дальнейшая циркуляция вирусов HPAI A/H5 среди птиц и млекопитающих создает угрозу появления нового вируса HPAI, способного передаваться от человека к человеку, и вызывает опасения по поводу возможной пандемии [2]. По этой причине ВОЗ призывает активизировать усилия по разработке вакцины против гриппа, вызываемого вирусами HPAI. Вакцины на основе мРНК обладают многими свойствами, необходимыми для создания вакцины против гриппа [3]. Платформа мРНК-вакцин позволяет организовать быстрое, экономичное и масштабируемое производство, в котором можно легко заменить целевой иммуноген, что особенно актуально в связи с высокой изменчивостью вируса гриппа. Кроме того, производство синтетических мРНК-вакцин не требует использования куриных эмбрионов, что позволяет избежать мутаций в последовательности иммуногена при наработке. мРНК-вакцины не вызывают у реципиента нежелательного иммунного ответа, свойственного векторным вакцинам, и, следовательно, могут вводиться многократно. Важным преимуществом также является эффективная активация как гуморального, так и клеточного иммунитета на мРНК-вакцину [4].

Цель работы состояла в разработке экспериментальной мРНК-вакцины, кодирующей гемагглютинин высокопатогенного вируса гриппа подтипа A/H5N8, и исследовании ее иммуногенных свойств на мышах линии BALB/c при доставке с помощью струйной инжекции.

В ходе работы была получена мРНК-вакцина против заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа A/H5 клады 2.3.4.4b, и получены данные о ее иммуногенных свойствах при введении с помощью струйной инжекции мышам линии BALB/c. С помощью иммуноферментного анализа было показано формирование специфических к рекомбинантному гемагглютинину антител (средний титр антител составил 1 : 175000). Т-клеточный иммунный ответ у иммунизированных мышей был исследован с помощью внутрикле-

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

© В. Р. Литвинова, Н. Б. Рудометова, В. А. Яковлев, Е. В. Тигеева, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, А. П. Рудометов, 2025

точного окрашивания цитокинов (ICS) и проточной цитометрии; было выявлено формирование специфического клеточного ответа, выраженного в значительном повышении количества лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ, IL2 и TNFα после стимуляции пулом специфических пептидов. Исследование вируснейтрализующей активности сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных мРНК-вакциной с помощью струйной инжекции, показало формирование нейтрализующих антител в отношении штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (средний титр нейтрализующих антител составил 1 : 1700). Исследование протективных свойств мРНК-вакцины показало ее способность защищать 100 % мышей линии BALB/c от заражения летальной дозой как гомологичного, так и гетерологичного штаммов вируса гриппа (A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) соответственно).

Литература

1. Kim D. H. et al. Newcastle disease virus expressing clade 2.3. 4.4 b H5 hemagglutinin confers protection against lethal H5N1 highly pathogenic avian influenza in BALB/c mice // Frontiers in Veterinary Science. 2025. Vol. 12. P. 1535274.

2. Ku C. C. et al. Vaccine optimization for highly pathogenic avian influenza: Assessment of antibody responses and protection for virus-like particle vaccines in chickens // Vaccine: X. 2024. Vol. 20. P. 100552.

3. Scorza F. B., Pardi N. New kids on the block: RNA-based influenza virus vaccines // Vaccines. 2018. Vol. 6, No. 2. P. 20.

4. Cagigi A., Douradinha B. Have mRNA vaccines sentenced DNA vaccines to death? // Expert Review of Vaccines. 2023. Vol. 22, No. 1. P. 1154–1167.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-339

ЛАНДШАФТ ДИСРЕГУЛЯЦИИ МИКРОРНК ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ И КОМОРБИДНОСТЯХ: ОБЩИЕ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ПАТТЕРНЫ *

THE LANDSCAPE OF MICRORNA DYSREGULATION IN METABOLIC SYNDROME AND COMORBIDITIES: COMMON AND TISSUE-SPECIFIC PATTERNS

М. М. Лопатин, М. М. Бограя, С. С. Воронова, М. А. Вульф, Л. С. Литвинова

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

M. M. Lopatin, M. M. Bograya, S. S. Voronova, M. A. Vulf, L. S. Litvinova

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

✉ mikhaillopatin28@gmail.com

Аннотация

Путем интегративного анализа мультитканевых транскриптомных данных пациентов с метаболическим синдромом и его осложнениями проявлена двухуровневая система дисрегуляции микроРНК: кросс-тканевые универсальные микроРНК поддерживают системное воспаление и метаболическую дисфункцию, а тканеспецифичные драйверы определяют развитие орган-селективных патологий. Результаты открывают путь к мультимаркерной диагностике и тканеселективной терапии.

Abstract

By integrative analysis of multi-tissue transcriptome data from patients with metabolic syndrome and its comorbidities, a two-level system of microRNA dysregulation was revealed: cross-tissue universal microRNAs support systemic inflammation and metabolic dysfunction, and tissue-specific drivers determine the development of organ-selective pathologies. The results open the way to multi-marker diagnostics and tissue-selective therapy.

Метаболический синдром (МС) представляет собой не просто совокупность факторов риска, а интегрированный патологический комплекс. Его ключевые компоненты — абдоминальное ожирение, дислипидемия (гипертриглицеридемия и снижение уровней липопротеинов высокой плотности), гипергликемия и артериальная гипертензия — взаимодействуют через общие патогенетические механизмы, главным образом инсулинорезистентность и метавоспаление [1]. Эта системная взаимосвязь закономерно приводит к развитию коморбидностей: как мультисистемных (включая сахарный диабет 2-го типа (СД2) и атеросклероз), так и заболеваний с преимущественно органоспецифичной манифестацией, например неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

МикроРНК являются важными регуляторами сложнооркестрированного патогенеза МС и его осложнений. При этом они демонстрируют парадокс: несмотря на системный характер МС, предполагающий кросс-тканевую дисрегуляцию микроРНК, их экспрессия зачастую обладает выраженной тканевой специфичностью. Кроме того, парадоксальным примером служит miR-223. В жировой ткани повышенная экспрессия miR-223 подавляет GLUT4, усиливая инсулинорезистентность [2]. В печени та же miR-223 ингибирует провоспалительные гены CXCL10 и TAZ, оказывая протективный эффект против стеатогепатита [3]. Этот тканеспецифичный дуализм, по-видимому, обусловлен дифференциальной экспрессией мишеней и контекст-зависимой передачей сигналов, подчеркивая сложность микроРНК-регуляторных сетей при МС. При этом механизмы межтканевой синергии микроРНК при системных метаболических нарушениях остаются малоизученными. Возникает вопрос: как согласуется/соотносится системная дисрегуляция микроРНК при МС с их тканеспецифичными профилями, особенно при развитии коморбидностей?

В качестве первого приближения к решению этого комплексного вопроса целью настоящего исследования стало выявление универсальных и тканеспецифичных микроРНК-регуляторов, ассоциированных с МС и его осложнениями с помощью интегративного анализа мультитканевых транскриптомных данных.

Из базы Gene Expression Omnibus были отобраны исследования микроРНК-профилирования для пациентов с МС и коморбидностями. Использовались образцы из тканей, релевантных патологиям (например, печень для НАЖБП, жировая ткань для ожирения, кровь для системных маркеров). Дифференциально экспрессируемые микроРНК (ДЭМ) идентифицировались при $|\log_2 FC| > 1$, FDR < 0,05. Учитывались как повышено-, так и понижено-экспрессируемые микроРНК.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания (проект № FZWM-2024-0012).

© М. М. Лопатин, М. М. Бограя, С. С. Воронова, М. А. Вульф, Л. С. Литвинова, 2025

Выявленные ДЭМ были классифицированы как кросс-тканевые (дисрегулированы в ⩾ 2 тканях) с вариабельным направлением экспрессии и универсальные и тканеспецифические (уникальны для 1 ткани). Для каждого класса ДЭМ проводился анализ обогащения биологических путей (GO, KEGG) по их предсказанным мишеням для выявления ассоциированных патогенетических процессов. Чтобы выявить функционально связанные групп микроРНК проводился анализ коэкспрессии и кластерный анализ (иерархическая кластеризация) всех ДЭМ на основе их паттернов $\log_2$FC.

В результате работы было обнаружено 304 уникальных ДЭМ, из которых 25 микроРНК показали универсальную (однонаправленную) дисрегуляцию независимо от типа коморбидности и локализации ткани (например, miR-143-3p), 16 ДЭМ были дисрегулированы кросс-тканево, но с вариабельным направлением (как let-7b-5p). Обнаружилось также, что локализация значительно больше формирует схожесть измененного микроРНК-профиля, чем сама патология.

Анализ коэкспрессии микроРНК выявил функциональные кластеры, ассоциированные с ключевыми патологическими процессами. В частности, был идентифицирован кластер воспаления, объединяющий микроРНК, совместно повышенные в жировой ткани и печени при НАЖБП и обогащенные мишенями в путях NF-κB/TNF-сигналинга, а также модуль фиброза, включающий микроРНК, специфично повышенные в печени (НАЖБП) и регулирующие гены внеклеточного матрикса (ECM) и TGF-β-пути.

Таким образом дисрегуляция микроРНК при МС формирует двухуровневую регуляторную систему, где универсальные паттерны поддерживают системное воспаление и метаболическую дисфункцию, а тканеспецифичные драйверы определяют развитие орган-селективных осложнений. Мультитканевое профилирование микроРНК-сигнатур открывает перспективы для ранней диагностики коморбидностей на основе мультимаркерных панелей и разработки тканеселективных терапевтических стратегий.

Литература

1. Saklayen M. G. The global epidemic of the metabolic syndrome // Current Hypertension Reports. 2018. Vol. 20, No. 2. P. 12.

2. Chuang T.-Y., Wu H.-L., Chen C.-C. et al. MicroRNA 223 expression is upregulated in insulin resistant human adipose tissue // Journal of Diabetes Research. 2015. Vol. 2015. P. 1–8.

3. He Y., Hwang S., Cai Y. et al. MicroRNA 223 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and cancer by targeting multiple inflammatory and oncogenic genes in hepatocytes // Hepatology. 2019. Vol. 70, No. 4. P. 1150–1167.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-340

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛОМНОГО ОТВЕТА ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКОГО АГЕНТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ ДЛЯ *IN VIVO* ФАРМАКОМЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА

INVESTIGATION OF THE METABOLOMIC RESPONSE OF A PROSPECTIVE ANTIPARKINSONIAN AGENT USING THE DRIED BLOOD SPOT METHOD FOR *IN VIVO* PHARMACOMETABOLOMIC ASSAY

М. К. Лысенко[1,2], Н. В. Басов[1,2], Н. Ю. Саушкин[3], Ж. В. Самсонова[3], Е. Г. Морозик[4], С. В. Аньков[2], А. Ю. Филиппова[2], А. В. Подтуркина[2], А. В. Павлова[2], А. Д. Рогачев[1,2], А. Г. Покровский[1], О. В. Ардашов[2], К. П. Волчо[2], Н. Ф. Салахутдинов[2]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[3]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[4]*Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва*

M. K. Lysenko[1,2], N. V. Basov[1,2], N. Yu. Saushkin[3], J. V. Samsonova[3], E. G. Morozik[4], S. V. Ankov[2], A. Yu. Filippova[2], A. V. Podturkina[2], A. V. Pavlova[2], A. D. Rogachev[1,2], A. G. Pokrovsky[1], O. V. Ardashov[2], K. P. Volcho[2], N. F. Salakhutdinov[2]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*
[3]*Lomonosov Moscow State University*
[4]*National Medical Research Center for Children's Health, Moscow*

✉ m.lysenko2@g.nsu.ru

Аннотация

Применение стекловолоконных материалов в методе сухих пятен крови обеспечивает наибольшее метаболомное покрытие по сравнению с целлюлозными. С их помощью возможна детекция ряда нуклеотидов, которые не выявляются при использовании целлюлозных карт. При использовании материала-лидера было проведено фармакометаболомное исследование противопаркинсонического агента и установлено его влияние на митохондриальные метаболические пути.

Abstract

Using glass fiber membrane materials in the dry blood spot method (DBS) provides the highest metabolomic coverage compared to cellulose. With their use it is possible to detect a number of nucleotides that are not detected with cellulose cards. Using the leader material, a pharmacometabolomic study of an antiparkinsonian agent was performed and its effect on mitochondrial metabolic pathways was determined.

Фармакометаболомика представляет собой перспективное направление в фармакологии, позволяющее изучать метаболические изменения в ответ на действие физиоактивных веществ. Этот подход открывает новые возможности для понимания механизмов действия лекарств, выявления биомаркеров эффективности терапии и прогнозирования ответа на лечение. В частности, фармакометаболомный скрининг может способствовать раскрытию патогенетических основ нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, которая в настоящее время является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, а число выявлений заболевания увеличивается.

Помимо аналитических методов, метаболомное покрытие в большой степени определяется методикой пробоподготовки образцов. При этом обеспечение высококачественной пробоподготовки, которая является важнейшим аспектом метаболомных исследований, во многом определяет достоверность и воспроизводимость получаемых данных. Одним из перспективных подходов к пробоподготовке цельной крови животных является метод сухих пятен крови (СПК). Выбор мембранного материала для получения СПК определяет спектр извлекаемых и детектируемых метаболитов.

Данное исследование ставит перед собой задачи определения мембранного материала «лидера» и использования его для обнаружения биомаркеров МФТП-индуцированного паркинсонизма и маркеров эффективности перспективного противопаркинсонического агента РА-96 [1].

© М. К. Лысенко, Н. В. Басов, Н. Ю. Саушкин, Ж. В. Самсонова, Е. Г. Морозик, С. В. Аньков, А. Ю. Филиппова, А. В. Подтуркина, А. В. Павлова, А. Д. Рогачев, А. Г. Покровский, О. В. Ардашов, К. П. Волчо, Н. Ф. Салахутдинов, 2025

Для выявления материала-лидера образцы цельной крови наносили на мембранные материалы различного состава (целлюлоза, стекловолокно) и высушивали. После экстракции образца сухой крови анализировали широкий спектр метаболитов при использовании разработанного ранее подхода [2]. Метаболомное покрытие оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни, дополнительно строили диаграммы Венна для визуализации пересечений в метаболомных профилях и уникальных метаболитов. При использовании материала-лидера были собраны образцы крови у мышей следующих групп: 1) мыши с МФТП (20 мг/кг, четырехкратно, внутрибрюшинно), получавшие РА-96 (20 мг/кг, однократно, внутрижелудочно) через 24 ч; 2) здоровые животные, получавшие РА-96 (20 мг/кг, однократно, внутрижелудочно). Для исследовательского и классификационного анализа применяли метод главных компонент (PCA), частичный наименьших квадратов — дискриминантный анализ (PLS-DA) и его разреженную модификацию (sPLS-DA).

По итогу скрининга мембранных материалов стекловолоконные стрипы из материалов JY-BX109 и Millipore GFCP 203000 продемонстрировали наилучшие аналитические характеристики: они обеспечивали наибольшее число детектируемых метаболитов, а также отличались наибольшим количеством уникальных метаболитов, включая нуклеотиды и их производные, такие как АТФ, АДФ, АМФ, УДФ, УМФ, дГДФ, дАМФ и аденин. Применимость стекловолоконных материалов для метаболомного скрининга обусловлена гладкой и непористой поверхностью, препятствующей проникновению жидкости внутрь и, следовательно, упрощающей вымывание метаболитов из образца сухой крови. Пористая гидрофильная структура целлюлозы, напротив, затрудняет экстракцию, поскольку образец распределяется как между волокнами, так и внутри них. Фармакометаболомный анализ подтвердил литературные данные о влиянии нейротоксина МФТП на уменьшение содержания триметиламин-N-оксида и L-карнитина в крови животных [3–5]. В настоящем исследовании впервые охарактеризована их динамика под влиянием противопаркинсонического агента РА-96 и возвращение к нормальному содержанию после 48 ч. Исходя из полученных результатов мы предполагаем, что воздействие МФТП приводило к митохондриальной дисфункции: нарушалась работа цепи переноса электронов, снижалось содержание пуриновых нуклеотидов, повышалась концентрация длинноцепочечных ацилкарнитинов. Одновременно отмечалось резкое снижение уровня сфингомиелинов через 24 ч после введения МФТП, что отражает нарушение липидного обмена. Введение РА-96 восстанавливало содержание молекул, ответственных за энергетический обмен в пределах тех же 24 ч.

Таким образом, показано, что в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма триметиламин-N-оксид и L-карнитин подтверждены как потенциальные маркеры патологического процесса, при этом впервые показано, что их уровни нормализуются под действием РА-96. Кроме того, выявлены нарушения энергетического и липидного метаболизма под действием МФТП (снижение содержания пуриновых нуклеотидов и сфингомиелинов, накопление длинноцепочечных ацилкарнитинов), нормализуемые РА-96 в течение 24 ч.

Литература

1. Gorina D. S., Lastovka A. V., Rogachev A. D. et al. Pharmacokinetics and dose proportionality study of a novel antiparkinsonian agent, a 1H-1,2,4-triazol-3-ylthio-conjugate of protremine // Molecules. 2024. Vol. 29. P. 44–98.

2. Basov N. V., Rogachev A. D., Aleshkova M. A. et al. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HILIC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole // Talanta. 2024. Vol. 267. P. 125–168.

3. Chung S. J., Rim J. H., Ji D. et al. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide as a biomarker in early Parkinson's disease // Nutrition. 2020. Vol. 83.

4. Chen S. J., Kuo C. H., Kuo H. C. et al. The gut metabolite trimethylamine N-oxide is associated with Parkinson's disease severity and progression // Movement Disorders. 2020. Vol. 35. P. 2115–2116.

5. Zhao H., Wang C., Zhao N. Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling // Journal of Chromatography B. 2018. Vol. 1081–1082. P. 101–108.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-341

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ ПО УРОВНЮ ДНКАЗНОЙ АКТИВНОСТИ IGG: СВЯЗЬ С АНТИ-ДНК-АНТИТЕЛАМИ И КЛИНИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ *

HETEROGENEITY OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS BASED ON IGG DNASE ACTIVITY: RELATIONSHIP WITH ANTI-DNA ANTIBODIES AND CLINICAL DATA

М. М. Меламуд, Е. А. Ермаков, В. Н. Бунева

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

M. M. Melamud, E. A. Ermakov, V. N. Buneva

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ Marken94@mail.ru

Аннотация

В работе изучалась связь ДНКазной активности IgG пациентов с СКВ с клиническими проявлениями заболевания. Установлено, что у пациентов с СКВ ДНКазная активность IgG выше, чем у здоровых доноров. У пациентов с СКВ уровень ДНКазной активности отрицательно ассоциируется с баллами по SELENA-SLEDAI. Пациенты с СКВ делятся на две выраженные группы с высокой и низкой ДНКазной активностью IgG, эти группы различаются по клиническим проявлениям заболевания.

Abstract

The study investigated the association between the DNase activity of IgG in SLE patients and the clinical manifestations of the disease. It was found that SLE patients exhibited higher IgG DNase activity compared to healthy donors. In SLE patients, the level of DNase activity was negatively associated with SELENA-SLEDAI scores. SLE patients were divided into two distinct groups with high and low IgG DNase activity, and these groups differed in their clinical disease manifestations.

Введение

Антитела играют огромную роль в патогенезе системной красной волчанки (СКВ). Известно, что антитела обладают рядом неканонических свойств, к которым относится, например, каталитическая активность. Одним из важных гипотетических антигенов в развитии СКВ является ДНК, в том числе внеклеточная. Показано, что при СКВ уровень гидролиза ДНК антителами повышается по сравнению со здоровыми донорами, однако на данный момент не изучалась связь активности этих антител с клиникой.

Материалы и методы

В исследовании использовалась плазма 56 пациентов с СКВ и 35 здоровых доноров. Клинико-анамнестические данные собирались квалифицированными врачами-ревматологами. Концентрация антител к одно- и двухцепочечной ДНК определялась методом ИФА. IgG были выделены методом аффинной хроматографии. Уровень ДНК-гидролизующей активности IgG оценивался с использованием ДНК-плазмиды pBluescsript методом агарозного гельэлектрофореза. Статистическая обработка данных проводилась в OriginPro 2021 и Google Colab.

Результаты

Уровень ДНКазной активности IgG пациентов с СКВ был достоверно выше, чем у здоровых доноров (рис. 1). На рис. 1 видно, что пациенты разделяются на две группы по уровню ДНКазной активности: группа высокой активности (ГВА; $n = 24$) и группа низкой активности (ГНА; $n = 32$). Это разделение было подтверждено методом ядерной оценки плотности (ЯОП) (рис. 2). Поскольку для ЯОП использовались прологарифмированные данные по основанию 10, то порог разделения 0,04 (см. рис. 2) является $10^{0,04} \approx 1$ нмоль/1 мг белка/1 ч. Медианный уровень ДНКазной активности IgG в ГВА был в 53,5 раза выше, чем в ГНА. При этом медианный уровень ДНКазной активности IgG в ГНА был в 13 раз выше, чем у здоровых доноров. Результаты представлены на рис. 3.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-15-00357).

© М. М. Меламуд, Е. А. Ермаков, В. Н. Бунева, 2025

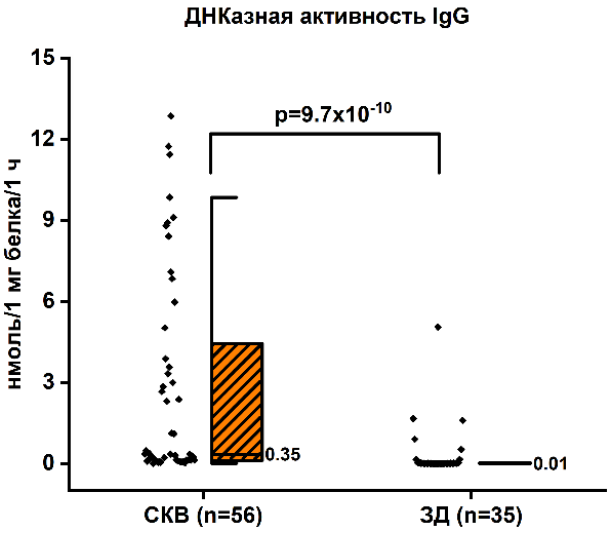


Рис. 1. Уровень ДНКазной активности IgG у пациентов с СКВ и здоровых доноров (ЗД)

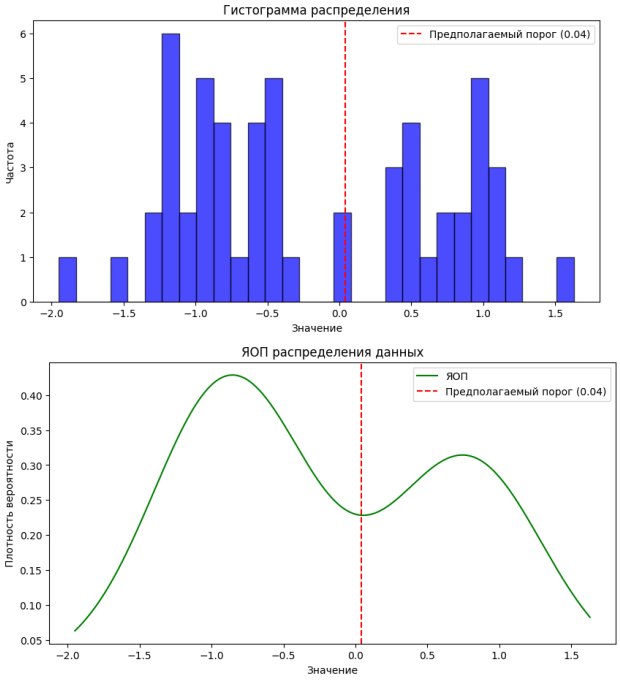


Рис. 2. Стратификация пациентов с СКВ по уровню ДНКазной активности методом ядерной оценки плотности (ЯОП)

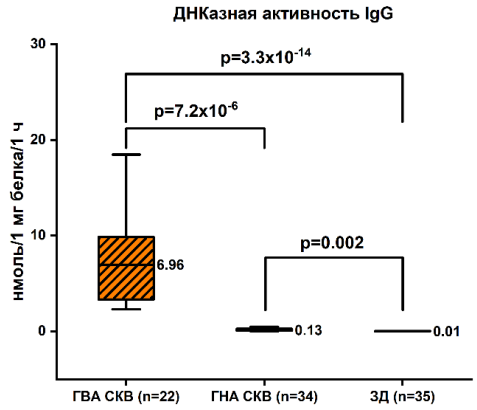


Рис. 3. Уровень ДНКазной активности IgG у пациентов из групп высокой (ГВА), низкой (ГНА) активности и здоровых доноров (ЗД)

Помимо того, что пациенты достоверно разделялись на две группы по уровню ДНКазной активности IgG, эти группы также различались по некоторым клиническим проявлениям заболевания. Различия между пациентами из групп ГВА и ГНА представлены в табл. 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов с СКВ из групп высокой (ГВА) и низкой (ГНА) ДНКазной активности IgG

Параметр	ГВА СКВ (*n* = 24)	ГНА СКВ (*n* = 32)	Р-значение
Анти-дцДНК АТ, нг/мл	77 (53, 251)	29 (13, 174)	0,04
Анти-оцДНК АТ, нг/мл	74 (37, 181)	12 (9, 141)	0,02
Возраст, годы	48 (41, 58)	53 (41, 61)	0,62
Длительность заболевания, годы	6 (3, 14)	12 (7, 20)	0,03
SELENA-SLEDAI, баллы	6 (4, 8)	8 (5, 10)	0,33
Течение (хроническое/подострое), %	17/83	42/58	0,048
Обострение (да/нет), %	92/8	71/29	0,08

Далее производилась оценка связи между уровнем ДНК-гидролизующей активности и тяжестью заболевания, выраженной в баллах по шкале SELENA-SLEDAI. Поскольку в ГВА и ГНА было недостаточно пациентов для проведения качественной оценки методом множественной линейной регрессии, анализ проводился для общей группы пациентов (n = 56). В качестве целевой переменной использовалась шкала SELENA-SLEDAI, предикторы представлены в табл. 2. Показано, что увеличение ДНКазной активности IgG обратно влияет на шкалу

SELENA-SLEDAI. Результаты представлены в табл. 2. Коэффициент регрессии для ДНКазной активности составил −0,1004 (см. табл. 2). Поскольку данные перед анализом подвергались логарифмированию по основанию 10, при возвращении в исходную шкалу коэффициент регрессии для ДНКазной активности составил $10^{-0,1004} = 0,794$. Это означает, что при увеличении ДНКазной активности на 1 единицу показатели SELENA-SLEDAI снижались на 20,6 %.

Таблица 2

Результат множественной регрессии для целевой переменной «шкала SELENA-SLEDAI» в общей группе пациентов с СКВ

Предикторы	β	Стандартная ошибка β	t-статистика	p-значение
ДНКазная активность IgG	−0,1004	0,045	−2,232	0,031
Уровень анти-дцДНК АТ	0,1803	0,116	1,556	0,128
Возраст	−0,0075	0,307	−0,025	0,981
Длительность заболевания	−0,1656	0,084	−1,976	0,055

Выводы

IgG пациентов с СКВ обладают повышенным уровнем ДНК-гидролизующей активности по сравнению со здоровыми донорами, что, по-видимому, связано с наличием большого количества иммуногенных ДНК-содержащих комплексов в крови пациентов. Обратная связь между ДНКазной активностью IgG и шкалой SELENA-SLEDAI может говорить о позитивной роли этой активности, скорее всего, за счет удаления ДНК-содержащих иммуногенных комплексов. Возможно, данная активность антител при СКВ окажется полезной в прогностических или терапевтических целях в будущем.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-342

ПРОИЗВОДНОЕ ПИПЕРАЗИНА, АКТИВАТОР TRPC6-КАНАЛА, ОБЛАДАЕТ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ *

A PIPERAZINE DERIVATIVE, TRPC6 CHANNEL ACTIVATOR, HAS NEUROPROTECTIVE PROPERTIES

Д. М. Мелентьева[1], Н. Зернов[2], В. С. Камарян[3], А. Т. Макичян[3], Л. С. Унанян[1,3], Е. А. Попугаева[1]

[1] *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*
[2] *Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН*
[3] *Российско-Армянский университет, Ереван, Армения*

D. M. Melenteva[1], N. Zernov[2], V. S. Kamaryan[3], A. T. Makichyan[3], L. S. Unanyan[1,3], E. A. Popugaeva[1]

[1] *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*
[2] *Pavlov Institute of Physiology RAS*
[3] *Russian-Armenian University, Yerevan, Armenia*

✉ melenteva.dm.m@gmail.com

Аннотация

Разработка терапии болезни Альцгеймера (БА) — актуальная задача. В данном исследовании, основанном на кальциевой теории БА, был идентифицирован активатор TRPC6-канала — cmp2. *In silico* и *in vitro* показана селективность cmp2 к TRPC6 и нейропротекторные свойства. *In vivo* cmp2 улучшал когнитивные и моторные функции 5xFAD-мышей. Данные результаты обосновывают дальнейшее изучение cmp2 для лечения БА, сфокусированного на восстановлении синаптической функции.

Abstract

The development of therapies for Alzheimer's disease (AD) is an urgent task. In this study, based on the calcium theory of AD, a cmp2 (activator of TRPC6 channel) was identified. It was confirmed *in silico* and *in vitro* that cmp2 activates TRPC6 selectivity and demonstrate neuroprotective properties. *In vivo*, cmp2 improved the cognitive and motor functions of 5xFAD mice. The findings support further study of cmp2 for AD treatment focused on restoring synaptic function.

Болезнь Альцгеймера — это нейродегенеративное заболевание, эффективное лечение которого остается сложной задачей, так как препараты, основанные на амилоидной гипотезе, часто демонстрируют противоречивые результаты. В качестве терапевтической стратегии, основанной на кальциевой теории БА, было выбрано воздействие на TRPC6-канал плазматической мембраны нейронов. Активация TRPC6 ранее показала нейропротекторный эффект [1].

В данном исследовании был проведен скрининг химических соединений с использованием баз данных ChEMBL и Zinc на основе фармакофора известного активатора TRPC6. Соединение лидер (cmp2) было выбрано с учетом параметров ADMET. Затем методами молекулярного докинга было определено место взаимодействия cmp2 с TRPC6, центральная часть мономера TRPC6. По результатам молекулярно-динамического моделирования рассчитана энергия связывания и выявлены силы, участвующие в ее образовании.

Способность cmp2 активировать кальциевый вход через TRPC6 была подтверждена путем кальциевой визуализации на HEK-клетках. При этом было показано отсутствие влияния cmp2 на структурно схожие каналы TRPC3 и TRPC7, что обуславливает селективность cmp2. Также *in vitro*, в культуре гиппокампальных нейронов, cmp2 в концентрации 100 нМ предотвращал деградацию грибовидных шипиков в условиях амилоидной токсичности [2].

Действие соединения, в концентрации 100 нМ, на переживающие срезы мозга мышей 5xFAD приводило к восстановлению синаптической пластичности. Результаты фармакокинетики показали возможность проведения поведенческих тестов на мышах с моделью БА (мыши линии 5xFAD). Соединение показало стабильность в плазме крови *in vivo*, проникало через гематоэнцефалический барьер и детектировалось в мозге мышей с периодом полужизни 30 мин [3].

* Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания по теме «Научно-методическое и ресурсное обеспечение реализации мероприятий по повышению эффективности деятельности российско-национальных (славянских) университетов в Республиках Армения, Беларусь, Кыргызстан и Таджикистан по подготовке кадров для цифровой экономики, в том числе с использованием современных дистанционных технологий».

© Д. М. Мелентьева, Н. И. Зернов, В. С. Камарян, А. Т. Макичян, Л. С. Унанян, Е. А. Попугаева, 2025

В ходе исследования были проведены поведенческие тесты «распознавание нового объекта», «водный лабиринт Морриса», «условно-рефлекторное замирание», «прогулка по перекладине». Экспериментальная группа мышей 5xFAD получала инъекции cmp2 в дозе 10 мг/кг в течение 14 дней, предшествующих первому в батарее тестированию, и далее в течение всего времени тестирования. Контрольные группы мышей дикого типа и линии 5xFAD получали инъекции эквивалентного количества ДМСО. Мыши с моделью БА демонстрировали ухудшение когнитивных способностей в вышеперечисленных тестах. В то же время у животных экспериментальной группы наблюдалось улучшение памяти распознавания и пространственной памяти, контекстной и условно-рефлекторной памяти. Также память страха мышей, получавших инъекции cmp2, сохранялась в течение 10 дней с момента обучения, в отличие от контрольной группы 5xFAD. Тест «прогулка по перекладине» показал способность cmp2 восстанавливать моторные функции, нарушенные у 8-месячных мышей линии 5xFAD [3].

Таким образом, мы предполагаем, что cmp2 является новым соединением-лидером для разработки терапии. Механизм действия cmp2 основан на селективной стимуляции TRPC6 и, как ожидается, предназначен для лечения синаптического дефицита в нейронах гиппокампа.

Литература

1. Popugaeva E. A., Chernyuk D. P., Zhang H. et al. Derivatives of piperazines as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease // Molecular Pharmacology. 2019. Vol. 95, No. 4. P. 337–348.

2. Zernov N. I., Ghamaryan V. S., Melenteva D. M. et al. Discovery of a novel piperazine derivative, CMP2: a selective TRPC6 activator suitable for treatment of synaptic deficiency in Alzheimer's disease hippocampal neurons // Scientific Reports. 2024. Vol. 14. P. 1–15.

3. Zernov N. I., Melenteva D. M., Ghamaryan V. S. et al. N,N-substituted piperazine, CMP2, improves cognitive and motor functions in 5xFAD mice // International Journal of Molecular Sciences. 2025. Vol. 26, No. 10.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-343

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕНАСЦИНА-С ПРИ АУТОДЕРМОПЛАСТИКЕ ОЖОГОВЫХ РАН *

EXPERIMENTAL RATIONALE FOR THE USE OF TENASCIN-C IN AUTODERMOPLASTY OF BURN WOUNDS

К. И. Мелконян, А. С. Асякина, Д. О. Соловий

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

K. I. Melkonyan, A. S. Asyakina, D. O. Soloviy

Kuban State Medical University, Krasnodar

✉ cnil@ksma.ru

Аннотация

Экспериментально установлено, что модификация аутодермопластики (АДП) тенасцином-С (TNC) способствует ускоренной эпителизации, неоангиогенезу и ремоделированию дермы при ожогах III степени. Применение TNC улучшает морфологические показатели заживления, повышает плотность коллагеновых волокон и восстанавливает структуру кожи, подтверждая его регенераторный потенциал.

Abstract

Experimental data demonstrate that the modification of autologous skin grafting with tenascin-C (TNC) promotes accelerated epithelialization, neoangiogenesis, and dermal remodeling in third-degree burns. TNC application improves morphological parameters of wound healing, increases collagen fiber density, and restores skin architecture, confirming its regenerative potential.

Ожоговые поражения кожи III степени характеризуются разрушением всех слоев кожного покрова с утратой структурной целостности внеклеточного матрикса и нарушением локального гомеостаза. Золотым стандартом хирургического лечения остается аутодермопластика (АДП), обеспечивающая репарацию за счет трансплантации собственных кожных лоскутов пациента [1]. Однако эффективность этого метода может снижаться при выраженном дефиците донорских участков.

В связи с этим возрастающий интерес представляет использование биологически активных молекул, способных модулировать микроокружение раны [2]. Одним из таких компонентов является тенасцин-С (TNC) — матриклеточный белок, физиологически экспрессируемый в условиях повреждения ткани [3, 4]. Его экзогенное введение может усиливать процессы клеточной миграции, ангиогенеза и ремоделирования внеклеточного матрикса, а также способствовать активации пролиферативной и синтетической активности клеток [5].

Цель исследования — оценка морфологических характеристик репаративного процесса при использовании АДП, модифицированного TNC, для лечения ожогового поражения у свиней.

Эксперимент проводился на свиньях породы ландрас возрастом 4 месяца. На каждом животном создавали ожог III степени по классификации А. В. Вишневского с помощью площадки, нагретой до 180–200 °C и контактировавшей с кожей 3–5 с. Размер ожоговой поверхности составлял 3 × 3 см. Животные были разделены на две группы — контрольная группа (n = 1) с использованием в качестве раневого покрытия АДП, опытная группа — АДП с добавлением TNC (200 нг/мл), нанесенного непосредственно перед имплантацией. На 14-е сутки образцы кожи эксплантировались для рутинного гистологического исследования (окрашивание гематоксилином и эозином).

В опытной группе на 14-е сутки наблюдалось полное покрытие раневой поверхности многослойным ороговевающим эпителием с четко выраженным базальным слоем. Соединительнотканный компонент характеризовался высокой плотностью упорядоченных коллагеновых волокон и выраженной неоваскуляризацией. В контрольной группе эпителизация носила неполный характер, отмечались участки незрелой грануляционной ткани с рыхлой структурой и сосуды, преимущественно с признаками пролиферативной активности эндотелия.

* Исследование выполнено за счет средств гранта по соглашению № 108-825-2024-014 от 17.10.2024 в рамках реализации Программы развития стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© К. И. Мелконян, А. С. Асякина, Д. О. Соловий, 2025

Проведенное экспериментальное исследование показало, что применение АДП, дополненной локальным введением TNC, способствует выраженному улучшению морфологических показателей заживления ожоговых ран III степени. Отмечено ускорение процессов ремоделирования внеклеточного матрикса, повышение степени неоангиогенеза и восстановление структурной организации дермы по сравнению с традиционной аутопластикой. Полученные данные свидетельствуют о потенциале TNC как биологически активного модулятора регенерации кожных покровов.

Литература

1. Yassaghi Y., Hamidi M., Karimian A. et al. Advancements in cell-based therapies for thermal burn wounds: a comprehensive systematic review of clinical trials outcomes // Stem cell research & Therapy. 2024. Vol. 15 (1). P. 277.

2. Cárdenas-León C. G., Mendoza-Rodríguez C. A., Martínez-Martínez A. et al. Matricellular proteins in cutaneous wound healing // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022. Vol. 10. P. 1073320.

3. Midwood K. S., Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis // Journal of cell communication and signaling. 2009. Vol. 3 (3). P. 287–310.

4. Choi Y. E., Park E. S., Kim D. H. et al. Effects of tenascin C on the integrity of extracellular matrix and skin aging // International journal of molecular sciences. 2020. Vol. 21 (22). P. 8693.

5. Wang Y., Wang G., Liu H. Tenascin-C: a key regulator in angiogenesis during wound healing // Biomolecules. 2022. Vol. 12 (11). P. 1689.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-344

СЕМЕЙНАЯ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ В ЯКУТИИ: КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАРАДОКС У ЯКУТОВ

FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA IN YAKUTIA: A CLINICAL AND GENETIC PARADOX AMONG THE YAKUTS

С. С. Местникова[1], А. В. Павлова[1], С. С. Эверстова[1,2], А. С. Асекритова[1,2], Е. С. Кылбанова[2], О. В. Татаринова[1,3], Д. Е. Иванощук[4], С. Е. Семаев[4], Е. В. Шахтшнейдер[4]

[1]Республиканская клиническая больница № 3, Якутск
[2]Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Якутск
[3]Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск
[4]НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

S. S. Mestnikova[1], A. V. Pavlova[1], S. S. Everstova[1,2], A. S. Asekritova[1,2], E. S. Kylbanova[2], O. V. Tatarinova[1,3], D. E. Ivanoshchuk[4], S. E. Semaev[4], E. V. Shakhtshneider[4]

[1]Republican Clinical Hospital No. 3, Yakutsk
[2]Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk
[3]Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems, Yakutsk
[4]Research Institute of Internal and Preventive Medicine — branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ Sargysem30@mail.ru

Аннотация

Проведено обследование 81 пациента с фенотипом семейной гиперхолестеринемии (г. Якутск). Патогенные варианты обнаружены в генах *LDLR* и *APOB* у 19,61 % пациентов русской этнической принадлежности. У пациентов якутской национальности патогенных вариантов, соответствующих критериям поиска, не выявлено. Диагностические критерии Голландских липидных клиник могут быть менее эффективны для диагностики СГХС в якутской популяции из-за этнических различий.

Abstract

A study was conducted involving 81 patients with a phenotype of familial hypercholesterolaemia (in the city of Yakutsk). Pathogenic variants were identified in the LDLR and APOB genes in 19.61 % of patients of Russian ethnic origin. No pathogenic variants meeting the search criteria were found in patients of Yakut nationality. The diagnostic criteria of the Dutch Lipid Clinics may be less effective for diagnosing familial hypercholesterolaemia in the Yakut population due to ethnic differences.

Введение

Семейная гиперхолестеринемия — генетически детерминированное моногенное нарушение липидного обмена с преимущественно аутосомно-доминантным типом наследования, сопровождающееся значительным повышением уровня холестерина липопротеинов низкой плотности в крови и ранним развитием и прогрессирующим течением атеросклероза, как правило, в молодом возрасте [1]. В связи с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СГХС своевременная диагностика этого заболевания становится критически важной. Молекулярно-генетическое тестирование играет ключевую роль в диагностике СГХС, позволяя выявлять патогенные варианты в генах, ответственных за метаболизм липидов, таких как *LDLR, APOB* и *PCSK9*. Это тестирование не только подтверждает диагноз у отдельных пациентов, но и позволяет проводить каскадный скрининг среди их родственников, что способствует раннему выявлению и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний в семьях, где имеется риск наследственной гиперхолестеринемии.

Материалы и методы

В липидном кабинете Центра предиктивной медицины и биоинформатики (ЦПМиБ) на базе ГАУ РС (Я) «Республиканская клиническая больница № 3» проведено комплексное обследование 81 пациента с клиническими признаками СГХС. Согласно диагностическим критериям Голландских липидных клиник (Dutch Lipid Clinic Network) [2] СГХС, у 51 пациента (62,96 %) была диагностирована определенная — 10 (19,6 %), вероятная — 21 (41,2 %) и возможная — 20 (39,2 %) СГХС. По этнической принадлежности 25 (49,0 %) участников опроса

© С. С. Местникова, А. В. Павлова, С. С. Эверстова, А. С. Асекритова, Е. С. Кылбанова, О. В. Татаринова, Д. Е. Иванощук, С. Е. Семаев, Е. В. Шахтшнейдер, 2025

идентифицировали себя по генеалогической анкете как якуты, в то время как 26 (51,0 %) отнесли себя к русским. В якутской этнической группе, согласно Голландским диагностическим критериям, средний балл составил 6,8 (вероятная СГХС), в то время как в русской группе он равен 5,2 (возможная СГХС).

На базе НИИТПМ — филиала Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) проведено прямое автоматическое секвенирование промотора и 18 экзонов гена рецептора *LDLR*, а также экзона 26 гена *APOB*.

Результаты и обсуждение

Патогенные варианты, подтверждающие наличие гетерозиготной СГХС, обнаружены у 10 (19,61 %) из 51 протестированного пациента. В гене *LDLR* мутация выявлена у 6 пациентов (60 % от выявленных случаев), а в гене *APOB* — у 4 пациентов (40 %). Все 10 пациентов принадлежали к русской этнической группе. У пациентов якутской национальности (n = 25) патогенных мутаций не выявлено, при этом в сравнении с русской этнической группой средний балл по диагностическим критериям Голландских липидных клиник выше (6,8 и 5,2 балла соответственно). Возможно, у якутов СГХС обусловлена патогенными вариантами в других генах (например, *PCSK9*), не включенных в данное исследование. Диагностические критерии Голландских липидных клиник могут быть менее эффективны для диагностики СГХС в якутской популяции из-за этнических различий в фенотипических проявлениях.

Заключение

Результаты исследования подчеркивают значимость этнически ориентированного подхода в диагностике семейной гиперхолестеринемии и других наследственных нарушениий липидного обмена.

Литература

1. Ежов М. В, Кухарчук В. В., Сергиенко И. В. и др. Нарушения липидного обмена. Клинические рекомендации 2023 // Российский кардиологический журнал. Т. 28, № 5. С. 5471.

2. World Health Organization. Familial hypercholesterolaemia: report of a second WHO consultation/ World Health Organization — Geneva: WHO, 1999. P. 33. URL: https://apps.who.int/iris/handle/10665/66346 (accessed: 12.07.2025).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-345

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ИНДУЦИРУЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ И ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ У КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА *

PRO-INFLAMMATORY ACTIVATION INDUCES MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND DRUG RESISTANCE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

Е. И. Мещерякова[1,2], И. В. Одинокова[1], М. И. Кобякова[1], Р. С. Фадеев[1]

[1] *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*
[2] *Институт биофизики клетки РАН, Пущино*

E. I. Meshcheriakova[1,2], I. V. Odinokova[1], M. I. Kobyakova [1], R. S. Fadeev[1]

[1] *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino*
[2] *Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino*

✉ elena.mesh2311@gmail.com

Аннотация

В представленной работе показано, что в условиях септической и асептической провоспалительной активации у клеток ОМЛ THP-1 изменяется митохондриальная функция и формируется лекарственная устойчивость на фоне изменения экспрессии генов антиапоптотических белков семейств BCL-2/IAP. Полученные данные важны для понимания механизмов формирования устойчивости клеток ОМЛ и разработки новых терапевтических стратегий.

Abstract

The presented work shows that in conditions of septic and aseptic proinflammatory activation, the mitochondrial function of TNR-1 cells of AML changes and drug resistance is formed against the background of changes in the expression of genes of antiapoptotic proteins of the BCL-2/IAP families. The data obtained are important for understanding the mechanisms of the formation of resistance of AML cells and the development of new therapeutic strategies.

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой агрессивное злокачественное заболевание кроветворной системы, характеризующееся нарушением дифференцировки и пролиферации миелоидных предшественников. Одной из основных проблем в лечении ОМЛ является развитие резистентности к химиотерапии, механизмы которой остаются недостаточно изученными. В последние годы особое внимание уделяется роли провоспалительного микроокружения в формировании лекарственной устойчивости лейкозных клеток. Известно, что митохондриальная дисфункция играет ключевую роль в регуляции провоспалительной клеточной активации и апоптоза и может быть связана с формированием лекарственной устойчивости.

Цель данного исследования состояла в изучении влияния различных типов провоспалительной активации на повышение резистентности и изменения митохондриальных функций клеток ОМЛ.

В качестве *in vitro* моделей септического воспаления использовали клетки THP-1, обработанные 150 мкг/мл зимозана A (THP-1Z) или 10 мг/мл липополисахарида (THP1-ЛПС) в течение 24 ч. В качестве *in vitro* модели асептического воспаления использовали клетки THP-1, которые культивировали в долговременных трехмерных высокоплотных культурах (THP-1ВПК). Для этого клетки высеивали в количестве 5×10^3 в 100 мкл питательной среды в лунки U-образного 96-луночного планшета и культивировали 5 суток без смены питательной среды, количество клеток в лунке вырастало до 1×10^5. Все сравнения проводили относительно клеток THP-1, которые культивировали в стандартных условиях — в условиях низкой плотности (THP-1НПК). Жизнеспособность клеток оценивали после 24 ч инкубации с химиотерапевтическими агентами с помощью резазурина на спектрофлуориметре Infinite F200. Митохондриальный потенциал, внутриклеточную продукцию активных форм кислорода и поверхностную экспрессию маркеров провоспалительной активации определяли методом проточной цитометрии с помощью флуоресцентных зондов DiOC6, DCFDA и антител CD11b-APC, CD11c-FITC и HLA-DR-PE соответственно. Концентрацию лактата, ФНО-альфа, ИЛ-6 и ИЛ-1бета в супернатанте определяли на спектрофотометре iMark. Клеточное дыхание исследовали *in situ* после пермеабилизации дигитонином в среде с сукцинатом, оценивая базальное, АДФ-зависимое и разобщенное дыхание. Определение содержания мРНК антиапоптотических белков семейств BCL-2 и IAPs проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе QuantStudio 5.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 075-00223-25-03.

© Е. И. Мещерякова, И. В. Одинокова, М. И. Кобякова, Р. С. Фадеев, 2025

Показано, что обработка клеток ОМЛ THP-1 липополисахаридом, зимозаном-А или культивирование в трехмерных высокоплотных культурах приводили к появлению у них маркеров провоспалительной клеточной активации. Выявлено, что в условиях как септической (THP-1ЛПС и THP-1Z), так и асептической (THP-1ВПК) провоспалительной активации у клеток ОМЛ THP-1 снижались активность дыхательной цепи митохондрий и митохондриальный потенциал на фоне повышения внутриклеточной продукции активных форм кислорода и содержания лактата в культуральной среде. В то же время только для клеток THP-1ВПК и THP-1ЛПС, но не THP-1Z, было характерно повышение устойчивости к химиотерапевтическим агентам, таким как этопозид, цитарабин и доксорубицин, на фоне изменения содержания мРНК антиапоптотических белков семейств BCL-2 и IAPs. В клетках THP-1ЛПС существенно увеличивалось содержание *BCL2A1, cIAP2* и снижалось содержание *BCL2* и *XIAP*. В клетках THP-1ВПК повышалось содержание *BCL2*, *BCL2L1* и *Livin*. В клетках THP-1Z достоверных изменений в экспрессии генов семейств BCL-2 и IAP не обнаружено.

Полученные данные свидетельствуют, что формирование лекарственной устойчивости у клеток ОМЛ может зависеть от типа провоспалительной активации и реализовываться за счет разных механизмов. Полученные данные важны для понимания механизмов формирования устойчивости при ОМЛ и разработки новых терапевтических стратегий.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-346

ИНГИБИРОВАНИЕ NONO КАК СТРАТЕГИЯ СЕЛЕКТИВНОГО ПОДАВЛЕНИЯ КЛЕТОК MYCN-АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ НЕЙРОБЛАСТОМЫ *

NONO INHIBITION AS A STRATEGY FOR THE SELECTIVE SUPPRESSION OF MYCN-AMPLIFIED NEUROBLASTOMA

О. О. Милетина[1], С. С. Погодаева[1], О. А. Кучур[1,2], Н. В. Антипова[2]

[1] *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[2] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

O. O. Miletina[1], S. S. Pogodaeva[1], O. A. Kuchur[1,2], N. V. Antipova[2]

[1] *ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ oomltn@gmail.com

Аннотация

Данное исследование оценивает влияние ингибирования NONO на жизнеспособность клеток нейробластомы с амплификацией MYCN, используя в качестве подавления ауранофин и/или siRNA. Установлено, что супрессия NONO селективно индуцирует апоптоз и подавляет пролиферацию клеток адренергического фенотипа. NONO позиционируется как перспективная терапевтическая мишень. Планируется изучение его роли в мезенхимальном подтипе.

Abstract

This study evaluates the impact of NONO inhibition on the viability of neuroblastoma cells with MYCN amplification, using auranofin and siRNA for suppression. It was found that NONO suppression selectively induces apoptosis and inhibits proliferation in cells of the adrenergic phenotype. NONO is positioned as a promising therapeutic target. Future studies will investigate its role in the mesenchymal subtype.

Нейробластома (НБ) — злокачественная опухоль, возникающая из незрелых нейрональных клеток и относящаяся к наиболее распространенным солидным опухолям у детей. Заболеваемость составляет 5–7 случаев на миллион детей в год, занимая третье место среди детских онкозаболеваний. Отличительной особенностью данной опухоли является ее выраженная гетерогенность, которая проявляется в наличии различных клеточных популяций, включая адренергический и мезенхимальный фенотип, каждый из которых регулируется специфической сетью транскрипционных факторов, известной как регуляторный кор генов — CRC (core regulatory circuit) [1]. Эта особенность значительно затрудняет разработку эффективных терапий, делая актуальным поиск ключевых молекулярных мишеней для целенаправленного воздействия.

Одним из наиболее агрессивных подтипов является MYCN-амплифицированная форма, которая ассоциирована с устойчивостью к стандартным методам лечения, включая химиотерапию и лучевую терапию, а также с неблагоприятным клиническим прогнозом. Регуляторный кор MYCN-амплифицированной адренергической НБ включает такие транскрипционные факторы, как ASCL1, PHOX2A, PHOX2B, GATA3 и HAND2, которые формируют сложную сеть взаимодействий, поддерживающую пролиферативный потенциал и выживаемость опухолевых клеток. Белок NONO, относящийся к семейству DBHS, выполняет функцию над-регулятора описанных транскрипционных факторов и стабилизирует их мРНК [2]. Эти процессы непосредственно влияют на экспрессию генов, таких как PHOX2B и HAND2, которые являются критически важными для поддержания опухолевого фенотипа. Кроме того, NONO демонстрирует способность взаимодействовать с длинными некодирующими РНК (lncRNA), в частности с lncUSMycN, усиливая экспрессию MYCN и способствуя прогрессии опухоли через активацию сигнальных путей, связанных с клеточной пролиферацией [3].

Настоящее исследование направлено на оценку эффектов ингибирования NONO в MYCN-амплифицированных клеточных линиях НБ, таких как Kelly и IMR-32, а также в линиях без соответствующей амплификации: SK-N-AS и стромальных клетках человека HS5. В экспериментах использовался ауранофин — ингибитор TrxR1 и NONO, в концентрациях от 0,25 до 2 мкМ. Линия Kelly оказалась в ~ 4 раза более чувствительной к низким концентрациям ауранофина, чем SK-N-AS и HS5, что говорит о более таргетном эффекте в адренергическом подтипе НБ. Результаты кПЦР показали, что при ауранофин-опосредованном подавлении NONO в линии Kelly наблюда-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-15-00097).
© О. О. Милетина, С. С. Погодаева, О. А. Кучур, Н. В. Антипова, 2025

ется увеличение экспрессии генов MYCN, HAND2, PHOX2A и PHOX2B, что также наблюдается при подавлении NONO с помощью целевой siRNA. С помощью метода проточной цитометрии была показана NONO-зависимая клеточная гибель, а результаты клоногенного анализа показали значительное снижение клеточной выживаемости при сочетании siNONO и 0,25 мкМ ауранофина (двойное подавление) в адренергическом подтипе НБ. Эти же комбинации не оказали значимого влияния на линию SK-N-AS и HS5.

Ингибирование NONO приводит к заметному снижению пролиферации НБ и сенсибилизирует линии, что позволяет рассматривать данный белок в качестве перспективной мишени для таргетной терапии. Предполагается, что комбинированный подход, включающий подавление NONO и модуляцию активности регуляторного кора, может стать основой для разработки новых терапевтических стратегий. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на детальном анализе роли NONO в различных подтипах НБ, включая мезенхимальный MYCN-неамплифицированный фенотип. Предполагается разработка высокоселективных малых молекул-ингибиторов NONO, что позволит минимизировать побочные эффекты и повысить терапевтическую эффективность.

Литература

1. Ciaccio R. et al. Targeting Oncogenic Transcriptional Networks in Neuroblastoma: From N-Myc to Epigenetic Drugs // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 12883.

2. Ronchetti D. et al. The pleiotropic nature of NONO, a master regulator of essential biological pathways in cancers // Cancer Gene Ther. 2024. Vol. 31. P. 984.

3. Pei Y. Liu et al. Effects of a Novel Long Noncoding RNA, lncUSMycN, on N-Myc Expression and Neuroblastoma Progression // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2014. Vol. 106. P. 7.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-347

МОДЕРНИЗАЦИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ COVID-19: ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

MODERNIZATION OF EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE IN THE CONTEXT OF THE COVID-19 PANDEMIC: DIGITAL TECHNOLOGIES AND MOLECULAR BIOLOGICAL RESEARCH

А. А. Монахова

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

A. A. Monakhova

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

✉ monaxova.angelina@mail.ru

Аннотация

Обзор посвящен цифровой трансформации эпидемиологического надзора COVID-19 в РФ (2020–2024 гг.), внедрению платформы SOLAR, инфодемиологических методов, математического моделирования и геномного мониторинга, что позволило повысить оперативность и точность эпидемиологического контроля и прогнозирования.

Abstract

The review is devoted to the digital transformation of COVID-19 epidemiological surveillance in the Russian Federation (2020–2024), the introduction of the SOLAR platform, infodemiological methods, mathematical modeling, and genomic monitoring, which has improved the efficiency and accuracy of epidemiological control and forecasting.

Цель — анализ и систематизация ключевых направлений цифровой и молекулярно-генетической трансформации системы эпидемиологического надзора в Российской Федерации в период пандемии COVID-19 (2020–2024 гг.).

Материалы и методы

Проведен систематический обзор научной литературы и аналитических данных, отражающих внедрение цифровых технологий (SOLAR), инфодемиологических подходов, математического моделирования и геномного мониторинга на платформе VGARus в систему эпиднадзора в РФ.

Результаты

Показано, что цифровая платформа SOLAR стала центральным элементом интеграции результатов ПЦР-диагностики COVID-19, обеспечив оперативность мониторинга и прогнозирования. Внедрение цифровых инструментов (интернет-запросы, математическое моделирование) повысило скорость и точность принятия решений. Особое значение приобрел геномный эпидемиологический мониторинг, позволивший прогнозировать появление новых вариантов SARS-CoV-2 и своевременно корректировать меры реагирования.

Выводы

Цифровая трансформация эпидемиологического надзора повысила его эффективность и сформировала основу для перехода к проактивной модели мониторинга, объединяющей молекулярно-генетические, клинические и поведенческие данные. Перспективным направлением остается дальнейшая интеграция информационных систем и расширение геномного мониторинга инфекций.

© А. А. Монахова, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-348

АНАЛИЗ КЛАСТЕРИЗАЦИИ СУБЪЕКТОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С ЦЕЛЬЮ ВСЕСТОРОННЕГО ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19)

ANALYSIS OF THE CLUSTERING OF THE CONSTITUENT ENTITIES OF THE RUSSIAN FEDERATION IN ORDER TO COMPREHENSIVELY STUDY THE DYNAMICS OF THE POPULATION'S INCIDENCE OF CORONAVIRUS INFECTION (COVID-19)

А. А. Монахова

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

A. A. Monakhova

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

✉ monaxova.angelina@mail.ru

Аннотация

В статье представлен кластерный анализ динамики заболеваемости COVID-19 в субъектах Российской Федерации. Выделены четыре группы регионов по уровню заболеваемости и отдельный кластер по полноте данных. Показана эффективность метода в выявлении территорий с высоким риском и оценке эпидемиологических тенденций.

Abstract

The article presents a cluster analysis of the dynamics of COVID-19 incidence in the constituent entities of the Russian Federation. Four groups of regions are identified based on the incidence rate, and a separate cluster is identified based on the completeness of data. The effectiveness of the method in identifying high–risk areas and assessing epidemiological trends is demonstrated.

Цель — проведение кластерного анализа динамики заболеваемости COVID-19 с целью выявления и оценки региональных различий эпидемического процесса в субъектах Российской Федерации в различные периоды пандемии.

Материалы и методы

Использовался метод кластерного анализа (алгоритм K-средних) на основе ежедневных интенсивных показателей заболеваемости COVID-19 среди населения субъектов Российской Федерации. Анализу предшествовала предварительная оценка полноты данных, по результатам которой регионы с долей пропущенных значений более 1 % были выделены в отдельный кластер и исключены из основной части анализа. В ходе исследования все субъекты РФ были сгруппированы в четыре основных кластера, отражающих уровень и динамику заболеваемости.

Результаты

По итогам кластерного анализа было выявлено, что кластер 0 характеризовался стабильно низким уровнем заболеваемости на протяжении всех периодов пандемии. В кластер 1 вошли субъекты с преимущественно низкими показателями заболеваемости, в то время как в кластер 2 были отнесены регионы с преимущественно высокими значениями. Кластер 3 включал регионы с постоянно высоким уровнем заболеваемости. Дополнительный кластер 4 образовали субъекты с высокой долей пропущенных данных. Среднесуточные показатели заболеваемости в кластерах повторяли динамику общероссийского показателя: с первого по пятый периоды пандемии наблюдался рост заболеваемости, тогда как с шестого по восьмой — снижение. Наиболее неблагополучными по уровню заболеваемости регионами за весь период пандемии были Хабаровский край, Санкт-Петербург и Москва.

Выводы

Кластерный подход позволил эффективно сгруппировать регионы без применения произвольных пороговых уровней заболеваемости и наглядно выявить различия в эпидемическом процессе на территории Российской Федерации. Анализ изменения принадлежности регионов к кластерам на различных этапах пандемии может быть полезен при оценке эффективности противоэпидемических мероприятий, а также для выявления территорий, требующих повышенного внимания с точки зрения эпидемиологического мониторинга и управления рисками.

© А. А. Монахова, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-349

БИОАКТИВНЫЕ ПОКРЫТИЯ НА 3D-ИМПЛАНТАТАХ ИЗ ТИТАНОВОГО СПЛАВА *

BIOACTIVE COATINGS ON 3D TITANIUM ALLOY IMPLANTS

К. В. Надараиа[1], И. М. Имшинецкий[1], М. А. Надараиа[1], А. И. Плешкова[1], И. В. Манжуло[2], Е. А. Белов[1], Д. В. Машталяр[1]

[1] *Институт химии ДВО РАН, Владивосток*
[2] *Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток*

K. V. Nadaraia[1], I. M. Imshinetskiy[1], M. A. Nadaraia[1], A. I. Pleshkova[1], I. V. Manzhulo[2], E. A. Belov[1], D. V. Mashtalyar[1]

[1] *Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok*
[2] *A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok*

✉ nadaraiakv@mail.ru

Аннотация

В работе представлен способ создания ортопедических имплантатов на основе селективного лазерного плавления с последующим нанесением биоактивного гибридного покрытия. Установлено наличие у покрытий развитой поверхностной структуры, в состав которой входит гидроксиапатит и биоактивные компоненты. Полученные материалы обладают антибактериальными и противоопухолевыми свойствами.

Abstract

The paper presents a method for creating orthopedic implants based on selective laser melting with subsequent application of a bioactive hybrid coating. The coatings have a developed surface structure, which includes hydroxyapatite and bioactive components. The resulting materials have antibacterial and antitumor properties.

На сегодняшний день перед исследовательскими коллективами по всему миру стоит задача создания новых имплантационных материалов для ортопедии, обладающих целым набором уникальных функциональных характеристик. Среди таких свойств можно в первую очередь выделить соответствие имплантируемого изделия анатомическим особенностям пациента, минимальный риск отторжения, противовоспалительные и противоопухолевые свойства, антибактериальную активность. К сожалению, на данный момент существуют лишь отдельные подходы к решению представленных задач. Так, к примеру, имплантат-ассоциированные инфекции с переменным успехом лечат путем системного введения антибиотиков. В связи с этим перспективной выглядит идея сочетания в одном имплантате целого спектра требуемых свойств, позволяющих перейти от простой биосовместимости к биоактивности.

В связи с этим в представленной работе нами были разработаны новые подходы к созданию биоактивных материалов для ортопедии. На первом этапе в качестве способа получения сетчатых образцов с заданной геометрией ячейки из порошка титанового сплава ВТ6 (система Ti-Al-V) был использован хорошо зарекомендовавший себя при создании персонализированных имплантатов метод селективного лазерного плавления (СЛП). Затем на полученные СЛП-образцы наносилось гидроксиапатитсодержащее пористое покрытие методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО). Применения метода ПЭО позволило формировать слой гидроксиапатита непосредственно в ходе каскада плазмохимических реакций. На третьем этапе на ПЭО-покрытие наносился слой полидофамина (ПДА) с иммобилизацией на поверхности и в порах покрытия витамина К2 (противовоспалительные свойства), золедроната (антирезорбтивные и противоопухолевые свойства) и ванкомицина (антибактериальные свойства). В результате нами были синтезированы биоактивные гибридные покрытия на образцах, полученных аддитивной технологией.

Анализ данных сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) свидетельствует о наличии у гибридных покрытий развитой структуры. Дополнительно данные рентгенофазового анализа подтвердили присутствие в покрытии гидроксиапатита, а результаты рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии — наличие биоактивных соединений.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-73-10044).

© К. В. Надараиа, И. М. Имшинецкий, М. А. Надараиа, А. И. Плешкова, И. В. Манжуло, Е. А. Белов, Д. В. Машталяр, 2025

Также путем анализа данных потенциодинамической поляризации и электрохимической импедансной спектроскопии было установлено наличие у гибридных покрытий высоких антикоррозионных свойств, превосходящих таковые у необработанного титанового сплава. Это, в свою очередь, способствует снижению выделения в ткани, окружающие имплантат, частиц микронного и субмикронного размера, тем самым предотвращая возникновение воспаления.

Гибридные покрытия демонстрируют яркий антибактериальный эффект, о чем свидетельствуют как данные СЭМ, так и образование зоны подавления роста *S. aureus* вокруг образцов за счет постепенной диффузии антибиотика. Более того, образцы с гибридным покрытием обладают цитотоксичностью в отношении клеток остеосаркомы человека. При этом отсутствует токсичность в отношении клеток фибробластов, что подтверждает направленное противоопухолевое действие таких материалов.

Путем проведения экспериментов с применение лабораторных животных (все эксперименты были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Национального научного центра морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН) было установлено, что образцы с гибридным покрытием не обладают местной и системной токсичностью.

Таким образом, в ходе данного исследования были получены новые биоактивные материалы, обладающие высокой биосовместимостью наравне с противоопухолевым и антибактериальным эффектами.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-350

СВЯЗЬ МЕЖДУ Т-КЛЕТОЧНЫМ ИММУНИТЕТОМ И ВАКЦИНАЦИЕЙ ПРОТИВ КОКЛЮША *

ASSOCIATION BETWEEN T-CELL IMMUNITY AND WHOOPING COUGH VACCINATION

З. К. Найденышева, А. В. Малеева, В. А. Шокина

НИИ системной биологии и медицины, Москва

Z. K. Naydenysheva, A. V. Maleeva, V. A. Shokina

Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow

✉ nzkchemistry@mail.ru

Аннотация

Коклюш — острое респираторное заболевание, вызванное бактерией *B. pertussis*. В данной работе было оценена динамика Т-клеточного ответа у взрослых доноров и реконвалесцентов в зависимости от типа детской вакцинации. После выделения PBMC инкубировались с *B. pertussis* в качестве антигена, в результате чего специфические Т-клетки активировались и продуцировали IFN-γ. Количество IFN-γ-продуцирующих клеток оценивалось методом ELISpot.

Abstract

Whooping cough is an acute respiratory disease caused by the bacterium *B. pertussis*. In this study, the dynamics of T-cell response in adult donors and reconvalescents depending on the type of pediatric vaccination was evaluated. After isolation, PBMCs were incubated with *B. pertussis* as antigen, resulting in specific T cells activation and IFN-γ production. The number of IFN-γ-producing cells was evaluated by ELISpot method.

На сегодняшний день основной способ профилактики коклюша — вакцинация цельноклеточной или бесклеточной вакциной. Цельноклеточная вакцина содержит инактивированные бактерии *Bordetella pertussis* и имеет высокую эффективность, однако для нее характерна высокая частота нежелательных явлений, включая аллергические реакции и серьезные неврологические осложнения. Бесклеточная вакцина, состоящая из доминантных белковых антигенов *B. pertussis*, имеет меньшую эффективность. Одна из предполагаемых причин — слабое вовлечение Т-клеточного звена и низкое содержание специфичных Т-клеток памяти.

С помощью метода ELISpot оценили наличие специфических Т-клеток против *B. pertussis* для доказательства важности формирования Т-клеточного звена при инфицировании.

Из полученных результатов следует, что у здоровых доноров присутствовали Т-клетки памяти против *B. pertussis* независимо от наличия и типа детской вакцинации и эпизодов заболевания в анамнезе. Количество клеток-ответчиков варьировалось от 0 до 486 × 10^6 PBMC (медиана — 123). Т-клетки памяти, отвечающие на *B. pertussis*, не у всех доноров являлись специфичными к доминантным антигенам, входящие в состав бесклеточных вакцин, что может объяснять ее ограниченную эффективность. Также у здоровых доноров наблюдались выраженные временные колебания количества коклюш-специфичных Т-клеток. Измерения проводились с интервалом 1–4 месяца, и амплитуда колебаний составляла 10–87 % (медиана — 42,4 %).

Для реконвалесцентов был характерен высокий уровень специфического Т-клеточного ответа после выздоровления (от 0 до 481 × 10^6 PBMC, медиана — 322). Со временем наблюдалось снижение ответа: на 15–65 % в течение первого месяца (медиана — 20,3 %), на 10–72 % к шестому месяцу (медиана — 63,1 %), на 17–100 % через 12 и более месяцев (медиана — 78 %). Количество или скорость снижения Т-клеточного ответа не зависят от типа детской вакцинации, поскольку они существенно не различались у реконвалесцентов.

Таким образом, полученные результаты показывают ключевую роль Т-клеточного иммунитета в контроле инфекции *B. pertussis*. Наличие неспецифичных к вакцинным антигенам Т-клеток памяти у доноров и нестабильность их уровня указывают на необходимость расширения антигенного состава будущих вакцин. Учитывание Т-клеточного звена при разработке вакцинных препаратов позволит повысить их эффективность и обеспечить более длительную защиту от коклюша.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 122030900051-9.

© З. К. Найденышева, А. В. Малеева, В. А. Шокина, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-351

ПИНЕНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЗААДАМАНТАНОВ: НОВЫЕ АГЕНТЫ С ДОФАМИНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ *

PINENE-DERIVED AZAADAMANTANES: NOVEL AGENTS WITH DOPAMINE-STIMULATING AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

М. П. Питухин[1], И. В. Сорокина[1], С. В. Айдагулова[1,2], М. С. Борисова[1], К. Ю. Пономарев[1], Т. Г. Толстикова[1], Е. В. Суслов[1], К. П. Волчо[1]

[1]*Новосибирский институт органический химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[2]*Новосибирский государственный медицинский университет*

M. P. Pitukhin[1], I. V. Sorokina[1], S. V. Aidagulova[1,2], M. S. Borisova[1], K. Yu. Ponomarev[1], T. G. Tolstikova[1], E. V. Suslov[1], K. P. Volcho[1]

[1]*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*
[2]*Novosibirsk State Medical University*

✉ pituhin@nioch.nsc.ru

Аннотация

Исследована дофаминостимулирующая и противовоспалительная активность пиненсодержащих азаадамантанов К-372, К-818 в моделях *in vivo*. Оба агента восстанавливали двигательную и исследовательскую активность мышей в модели МФТП-паркинсонизма и уменьшали гистаминовый отек, а К-372 также снижал Т-клеточный отек лапы. Эффективность превосходила амантадин, что подчеркивает перспективность соединений как мультитаргетных нейропротекторов.

Abstract

Dopamine-stimulating and anti-inflammatory activities of pinene-derived azaadamantanes K-372 and K-818 were studied *in vivo*. Both agents significantly improved locomotor and exploratory activity in the MPTP Parkinsonism model and reduced histamine paw edema; K-372 also lessened T-cell-mediated swelling. Their efficacy surpassed amantadine, underscoring the potential of these multitarget neuroprotectants.

Общими чертами нейродегенеративных заболеваний являются гибель нейронов, нарушение работы нейромедиаторных систем, нейровоспаление и феномен эксайтотоксичности глутамата. Препарат амантадин (1-аминоадамантан, АМД) используется для снижения неврологического дефицита при болезни Паркинсона и рассеянном склерозе [1]. Предполагается, что его клинические эффекты обусловлены синергией дофаминостимулирующего, NMDA-блокирующего и противовоспалительного эффектов. Однако ограниченная клиническая эффективность АМД способствует поиску более перспективных альтернативных средств [2]. Данная работа посвящена исследованию активности новых N-замещенных адамантанов (азаадамантанов), К-372 и К-818, имеющих в структуре пиненовый фрагмент.

Цель — исследовать дофаминостимулирующую и противовоспалительную активность двух пиненовых производных азаадамантанов К-372 и К-818 в сравнении с АМД на моделях *in vivo*.

Материалы и методы

Агенты К-372 и К-818 впервые синтезированы в Лаборатории направленных трансформаций природных соединений НИОХ СО РАН. В качестве референтных агентов использовали АМД, а также индометацин (ИНД) и дексаметазон (ДЕК).

Дофаминостимулирующую активность соединений определяли в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма [3]. Самцам мышей C57BL/6J проводили инъекции МФТП, на следующий день животным вводили исследуемые агенты (20 мг/кг, в/б) и через час оценивали активность животных в тесте «открытое поле». МФТП вызывает нейровоспаление и избирательную гибель дофаминергических нейронов, что приводит к изменениям локомоторной активности животных.

Противовоспалительная активность соединений оценивалась в трех различных по механизмам моделях воспаления [4].

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 075-00365-25-00.

© М. П. Питухин, И. В. Сорокина, С. В. Айдагулова, М. С. Борисова, К. Ю. Пономарев, Т. Г. Толстикова, Е. В. Суслов, К. П. Волчо, 2025

Модель гистаминового отека (неиммунную) воспроизводили введением в заднюю лапу мышей CD-1 раствора гистамина.

Модель псевдоаллергического воспаления воспроизводили путем введения в заднюю лапу мышей линии C57BL/6J раствора конканавалина-А.

В модели Т-клеточного воспаления мышей линии CBA сначала иммунизировали овальбумином, а затем проводили реакцию гиперчувствительности замедленного типа суспензией агрегированного овальбумина в лапу животного.

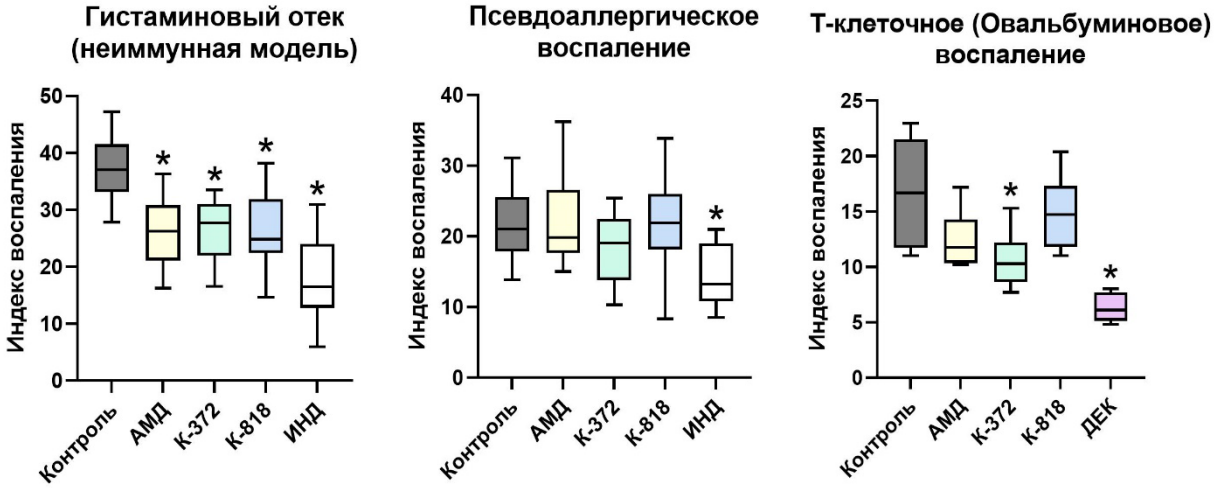
Во всех моделях степень отека определяли по относительному увеличению массы воспаленной лапы против интактной.

Статистический анализ данных выполняли с помощью программы GraphPad Prism 10.4.2. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна — Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В модели МФТП-индуцированного паркинсонизма обнаружено, что К-372 и К-818 значимо увеличивают как локомоторную активность («количество движений», «время в движении», «дистанция»), так и показатели исследовательского поведения (К-372 — «норковый рефлекс», К-818 — «вертикализация») по сравнению с контролем. Аналогичные эффекты АМД не имели значимого характера.

При исследовании противовоспалительной активности (см. рисунок) установлено, что агенты К-372, К-818 снижают гистаминовый отек у животных на 25–30 % ($p < 0,001$), данный показатель сопоставим с АМД (28,9 %, $p < 0,001$). В модели псевдоаллергического воспаления значимого эффекта агентов не обнаружено. В модели Т-клеточного воспаления агент К-372 уменьшает степень отека на 38,4 % ($p = 0,04$), а АМД и К-818 оказывают недостоверный противовоспалительный эффект ($p > 0,10$).



Влияние агентов на индекс воспаления в различных моделях (Median/Quartile/Range). * — $p < 0,05$ vs контроль

Выводы

1. К-372 и К-818 демонстрируют выраженный дофаминостимулирующий эффект, превосходящий действие АМД.

2. Все агенты (К-372, К-818, АМД) снижают неиммуногенный отек на 25–30 %, а агент К-372 дополнительно снижает иммуногенный отек в модели Т-клеточного воспаления.

3. Таким образом, среди пиненовых производных азаадамантанов были выявлены новые агенты с дофаминостимулирующей и противовоспалительной активностью — перспективные мультитаргетные нейропротекторы.

Литература

1. Пилипович А. А., Голубев В. Л. Амантадин в современной неврологической практике // Нервные болезни. 2023. Т. 1. С. 23–30.

2. Rujirussawarawong S. et al. Efficacy and safety of oral amantadine in Parkinson's disease with dyskinesia and motor fluctuations: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials // BMJ Neurology Open. 2025. Vol. 7, No. 1.

3. Jackson-Lewis V., Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease // Nature protocols. 2007. Vol. 2, No. 1. P. 141–151.

4. Миронов А. Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. М.: НЦЭМСП, 2012. С. 942.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-352

ВОЗМОЖНОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЕМ У ЛИЦ С СИНДРОМОМ ЗАВИСИМОСТИ *

POTENTIAL FOR BIOCHEMICAL PREDICTION OF ALCOHOL ABUSE RELAPSE IN INDIVIDUALS WITH DEPENDENCE SYNDROME

К. А. Попов, Г. А. Ермакова, И. М. Быков

Кубанский государственный университет, Краснодар

K. A. Popov, G. A. Ermakova, I. M. Bykov

Kuban State Medical University, Krasnodar

✉ naftalin444@mail.ru

Аннотация

В работе проанализированы возможности прогнозирования рецидивирования употребления алкоголем у лиц с синдромом зависимости на этапе проведения реабилитационно-противорецидивного курса терапии на основе мониторинга лабораторных биомаркеров. Было установлено, что сниженные на каждые 100 пг/мл концентрации BDNF в сыворотке крови на этапе начала реабилитации характеризуются ростом вероятности последующего рецидива на 5 % в течение последующих 6 месяцев.

Abstract

The article analyzes the possibilities of predicting relapse of alcohol use by individuals with addiction syndrome at the stage of rehabilitation and anti-relapse therapy based on monitoring laboratory biomarkers. It was found that BDNF concentrations in the blood serum at the beginning of rehabilitation are characterized by an increase in the probability of subsequent relapse by 5 % over the next 6 months, reduced by every 100 pg/ml.

Ключевой проблемой употребления алкоголя является развитие синдрома зависимости, который характеризуется патологическим влечением и высоким риском рецидивирования [1]. Одним из инструментов решения данной проблемы является прогнозирование риска рецидива употребления психоактивных веществ [2]. В работе проанализирована зависимость риска рецидивирования употребления алкоголя в первые 6 месяцев после начала реабилитации больных с синдромом зависимости от исходного сывороточного содержания некоторых нейропептидов и гормонов.

В исследование были включены 38 больных с синдромом зависимости в результате употребления алкоголя (F10.252 по МКБ). По данным химико-токсикологического анализа через 6 месяцев у 12 из 38 пациентов наблюдался рецидив употребления алкоголя. Спектр биохимических исследований крови наблюдаемых лиц включал определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Перечень пептидов, белков и гормонов, определяемых иммуноферментными методами, включал мозговой и глиальный нейротрофические факторы (BDNF и GDNF), орексин, нейропептид Y (NPY), полипептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза (PACAP), адренокортикотропный гормон (АКТГ) и кортизол [3]. Для определения использовали наборы реагентов Cloud-Clone Corp (Китай). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 96 от 29 января 2021 г.).

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием программы AnalystSoft Inc., StatPlus. Сравнение данных выполняли по критерию Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0{,}05$. Для оценки связи лабораторных показателей с наступлением рецидива использовали метод логистической регрессии.

Дифференциация больных по признаку наступления рецидива или поддержания ремиссии по прошествии 6 месяцев наблюдения и скрининга употребления алкоголя позволила выявить статистически значимые различия. Так, у лиц, которые сохранили воздержание от употребления алкоголя, исходный уровень BDNF был в 2,3 раза выше, чем в группе с рецидивом заболевания ($p = 0{,}001$). Содержание GDNF в аналогичных условиях было на 75 % выше в подгруппе больных без рецидива употребления спиртосодержащих напитков ($p = 0{,}003$). Со-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда (проект № 24-15-20010).

© К. А. Попов, Г. А. Ермакова, И. М. Быков, 2025

держание в крови NPY, орексина, PACAP, КТГ и кортизола не различалось в подгруппах больных в зависимости от последующего исхода. Также не было никаких различий биохимических маркеров (АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ) в крови больных, воздерживающихся от употребления алкоголя в течение 6 месяцев или вернувшихся к пагубной привычке.

Для оценки вероятности развития рецидива у больных с синдромом зависимости от алкоголя была применена логистическая регрессия. Не было выявлено статистически значимого влияния индекса массы тела, концентрации АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ, NPY, PACAP, орексина, кортизола и АКТГ. Использование для создания регрессионной модели BDNF позволило получить лучшие результаты (p = 0,018). Сниженные на каждые 100 пг/мл концентрации BDNF в сыворотке крови характеризуются ростом вероятности последующего рецидива на 5 %.

Результаты исследования продемонстрировали потенциальную возможность стратификации больных с синдромом зависимости от алкоголя, поступающих на реабилитацию, по уровню риска развития рецидива в первые 6 месяцев с использованием лабораторных биомаркеров, таких как BDNF. Такая возможность в перспективе может стать основой персонифицированного подхода к разработке стратегии лечения и реабилитации больных наркологического профиля, а также мониторинга эффективности данного процесса.

Литература

1. Алексеенко С. Н., Губарев С. В., Зубко А. В. и др. Проблема потребления алкоголя в медицинской студенческой среде // Здравоохранение Российской Федерации. 2024. Т. 68, № 4. С. 323–330.

2. Honarvar F., Arfaie S., Edalati H. et al. Neuroanatomical predictors of problematic alcohol consumption in adolescents: a systematic review of longitudinal studies // Alcohol and Alcoholism. 2023. Vol. 58, No. 5. P. 455–471.

3. Ермакова Г. А., Быков И. М., Попов К. А. и др. Содержание белковых маркеров и гормонов в сыворотке крови и ротовой жидкости у больных с синдромом алкогольной зависимости // Инновационная медицина Кубани. 2024. Т. 9, № 4. С. 38–43.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-353

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЛОКАТОРА TRPV1-КАНАЛА, ПЕПТИДА HCRG21, В МОДЕЛИ ОСТРОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У МЫШЕЙ *

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE TRPV1 CHANNEL BLOCKER, PEPTIDE HCRG21, IN A MOUSE MODEL OF ACUTE SYSTEMIC INFLAMMATION

Н. А. Прийменко[1,2], А. Н. Кветкина[1], А. А. Климович[1], Ю. В. Дерявко[1], Д. В. Попкова[1], Э. Ю. Овчинникова[1,2], И. Н. Гладких[1], Е. В. Лейченко[1,2]

[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
[2]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

N. A. Priymenko[1,2], A. N. Kvetkina[1], A. A. Klimovich[1], Yu. V. Deryavko[1], D. V. Popkova[1], E. Yu. Ovchinnikova[1,2], I. N. Gladkikh[1], E. V. Leychenko[1,2]

[1]Yelyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok
[2]Far Eastern Federal University, Vladivostok

✉ priimenko.na@dvfu.ru

Аннотация

Пептид HCRG21 морской анемоны *Heteractis magnifica* проявлял выраженное противовоспалительное действие в *in vivo* модели острого системного воспаления, вызванного липополисахаридом: значительно снижал тяжесть симптомов воспаления (слабости, диареи, тахипноэ, гипотермии), регулировал показатели крови и продукцию провоспалительных цитокинов.

Abstract

HCRG21 peptide of the sea anemone *Heteractis magnifica* demonstrated a pronounced anti-inflammatory effect *in vivo* model of acute systemic inflammation caused by lipopolysaccharide: it significantly reduced the severity of inflammatory symptoms (weakness, diarrhea, tachypnea, hypothermia), regulated blood parameters and the production of pro-inflammatory cytokines.

При моделировании воспалительного процесса в экспериментах в качестве провоспалительного агента часто используют бактериальный эндотоксин или липополисахарид (ЛПС) — основной компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий [1]. ЛПС является сильным пирогеном и при попадании в кровь играет ключевую роль в системном воспалении путем стимуляции макрофагов через толл-подобный рецептор 4 (TLR4), гиперактивация которого инициирует сигнальный каскад, вызывающий чрезмерную выработку различных провоспалительных факторов (цитокинов, хемокинов и др.).

Ионный канал переменного рецепторного потенциала ваниллоидного типа 1, TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid type 1), выступает ключевым интегратором болевых и воспалительных сигналов, активируясь под воздействием эндогенных и экзогенных лигандов, критического повышения температуры (до 43 °C) и закисления [2]. Ранее было показано, что ЛПС способен сенсибилизировать TRPV1 через TLR4-опосредованный механизм. Так, ЛПС-зависимая активация TLR4 вызывала сенсибилизацию TRPV1 и продукции IL-6, тогда как применение антагониста TLR4 (LPS-RS) приводило к снижению количества $TRPV1^{+}$-нейронов и подавлению воспалительной реакции [3, 4].

Яд морских анемон содержит комплекс разнообразных биологически активных соединений, способных воздействовать на ионные каналы, рецепторы, протеазы и другие молекулярные мишени. Установлено, что пептид семейства Кунитца, HCRG21 (56 а. о., 6228 Да), из морской анемоны *Heteractis magnifica*, способен блокировать активность TRPV1-канала и оказывать пролонгированный анальгетический эффект в тесте «горячая пластина», а также проявлять выраженную противовоспалительную активность, ингибируя отек лапы мыши, вызванный каррагинаном и снижая продукцию фактора некроза опухоли-α (TNF-α) до контрольного уровня [5–7]. В данном исследовании мы провели комплексную оценку влияния рекомбинантного пептида HCRG21 на симптоматику,

* Исследование выполнено за счет средств субсидии федерального бюджета в рамках реализации Программы развития Дальневосточного федерального университета в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© Н. А. Прийменко, А. Н. Кветкина, А. А. Климович, Ю. В. Дерявко, Д. В. Попкова, Э. Ю. Овчинникова, И. Н. Гладких, Е. В. Лейченко, 2025

клинические показатели крови и экспрессию провоспалительных цитокинов у экспериментальных животных с индуцированным ЛПС острым системным воспалением.

Исследования проводили на половозрелых самцах белых мышей линии CD-1, возрастом 6 недель, весом 30 ± 2,5 г. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий препарат из группы нестероидных противовоспалительных средств — диклофенак (Хемофарм А. Д., Сербия), широко применяемый для купирования воспаления и болевого синдрома различного генеза, отрицательного контроля — эквивалентный объем воды для инъекции. Пептид, диклофенак и воду вводили животным внутримышечно, ЛПС — внутрибрюшинно. Острая системная воспалительная реакция, вызванная ЛПС, проявлялась у мышей такими клиническими симптомами, как снижение двигательной активности и мышечного тонуса, слабость, нарушение координации движения, гипотермия, тахипноэ (учащенное поверхностное дыхание), диарея и слабая реакция на внешние раздражители.

Установили, что введение HCRG21 в дозе 0,1 мг/кг оказывает выраженное терапевтическое воздействие, уменьшая тяжесть проявления основных симптомов воспаления, что сопоставимо с эффектом диклофенака, применявшегося в значительно большей дозе (12,5 мг/кг). Анализ клинических показателей крови показал, что введение HCRG21, подобно диклофенаку, способствует коррекции лейкоцитарного сдвига при воспалительном процессе, нормализации содержания моноцитов и эозинофилов, а также тромбоцитов и тромбоцитокрита, приближая их значения к показателям, характерным для здоровых животных. Методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) было выявлено, что пептид значительно подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-6, и IL-1β, но, не COX-2 и iNOS, в отличие от диклофенака, а также усиливает продукцию противовоспалительного цитокина IL-10, что также отличается от механизма противовоспалительного действия диклофенака.

Таким образом, HCRG21, являясь негативным модулятором TRPV1-канала, проявляет выраженное противовоспалительное действие, нормализуя внешние клинические признаки и показатели крови, подавляя экспрессию генов основных провоспалительных цитокинов и способствуя экспрессии противовоспалительного цитокина.

Литература

1. Ислаев А. А., Чибирова Т. Т., Такоева Е. А. и др. Липополисахарид-индуцированная модель воспаления в клеточных культурах // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 19–30.

2. Kittaka H., Tominaga M. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin // Allergology International. 2017. Vol. 66, No. 1. P. 22–30.

3. Li Y., Adamek P., Zhang H. et al. The cancer chemotherapeutic paclitaxel increases human and rodent sensory neuron responses to TRPV1 by activation of TLR4 // The Journal of Neuroscience. 2015. Vol. 35, No. 39. P. 13487–13500.

4. Sattler K., El-Battrawy I., Cyganek L. et al. TRPV1 activation and internalization is part of the LPS-induced inflammation in human iPSC-derived cardiomyocytes // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, No. 1. P. 14689 (1–12).

5. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E. et al. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone Heteractis crispa is a full antagonist of the TRPV1 receptor // Marine Drugs. 2016. Vol. 14, No. 12. P. 229.

6. Sintsova O. V., Palikov V. A., Palikova Y. A. et al. Peptide blocker of ion channel TRPV1 exhibits a long analgesic effect in the heat stimulation model // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020. Vol. 493, No. 1. P. 215–217.

7. Sintsova O., Gladkikh I., Klimovich A. et al. TRPV1 blocker HCRG21 suppresses TNF-α production and prevents the development of edema and hypersensitivity in carrageenan-induced acute local inflammation // Biomedicine. 2021. Vol. 9, No. 7. P. 1–11.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-354

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАНЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАВЕРНОЗНОГО И СИСТЕМНОГО СКЛЕРОЗА У МУЖЧИН: ВЫБОР МАРКЕРОВ НА ОСНОВЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

A PREDICTIVE GENETIC PANEL FOR THE DIAGNOSIS OF CAVERNOUS AND SYSTEMIC SCLEROSIS IN MEN: MARKER SELECTION BASED ON BIOINFORMATICS ANALYSIS

М. И. Пчелинцев[1], М. К. Меньщиков[2], К. А. Меньщиков[2]

[1]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*
[2]*Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва*

M. I. Pchelintsev[1], M. K. Menshchikov[2], K. A. Menshchikov[2]

[1]*I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*
[2]*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow*

✉ michaelpchelintsev@mail.ru

Аннотация

Кавернозный и системный склероз у мужчин проявляются фиброзом и утратой эластичности тканей. Для прогнозирования фиброза и планирования имплантационной хирургии предложена генетическая панель из ключевых генов и SNPs (TGFB1, MMP9, COL1A1, ELN, IL6, STAT4). Биоинформатический анализ показал, что выбранные варианты локализуются в консервативных участках и имеют функциональную значимость.

Abstract

Cavernous and systemic sclerosis in men manifest as fibrosis and loss of tissue elasticity. To predict fibrosis and guide implant surgery planning, we propose a genetic panel of key genes and SNPs (TGFB1, MMP9, COL1A1, ELN, IL6, STAT4). Bioinformatic analysis demonstrated that these variants reside in conserved regions and hold functional significance.

Введение

Кавернозный фиброз (болезнь Пейрони) и системный склероз у мужчин приводят к избыточному накоплению внеклеточного матрикса и утрате эластичности кавернозных тел, что вызывает искривление пениса, болевой синдром и снижение качества эректильной функции [1]. Фибротическая трансформация тканей существенно ухудшает результаты имплантационной урологии: осложняет дилатацию кавернозных тел, повышает риск перфорации, миграции или поломки протеза и приводит к неудовлетворительным эстетическим и функциональным исходам. При системном склерозе у вплоть до 50 % мужчин развивается «склеродермический пенис» с артериальной и венозной дисфункцией, делающей эректильную дисфункцию практически неизбежной [2]. В связи с этим необходима стратегия предоперационной стратификации на основе генетических маркеров фиброза для прогнозирования тяжести склеротических изменений и оптимизации хирургической тактики.

Цель — разработать тест-систему генов и SNPs, ассоциированных с фиброзом кавернозных и системных тканей у мужчин, и провести комплексный биоинформатический анализ их функциональной значимости для прогнозирования исходов имплантационной урологии.

Материалы и методы

Из международных баз данных (Ensembl, NCBI, dbSNP, UniProt) выбраны семь генов: TGFB1, MMP9, COL1A1, ELN, IL6, STAT4 и SHARPIN. Извлечены все нуклеотидные последовательности данных генов, находящиеся в открытом доступе. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей экзон-интронных участков и промоторов выполнено в UGENE (алгоритм MUSCLE), параллельно с выравниванием аминокислот с учетом рамок считывания. Филогенетический анализ вариантов проведен методом Neighbor-Joining на основе модели Kimura 2-Parameter с 1000-кратным bootstrap. Консервационные оценки позиций получены с помощью ConSurf; позиционная энтропия рассчитана в Jalview. Регуляторные эффекты SNP исследованы в RegulomeDB и Human Splicing Finder.

© М. И. Пчелинцев, М. К. Меньщиков, К. А. Меньщиков, 2025

Результаты

Множественное нуклеотидное выравнивание семи ключевых генов панели (TGFB1, MMP9, COL1A1, ELN, IL6, STAT4, SHARPIN) выявило несколько высококонсервативных участков, содержащих функционально значимые SNP. Филогенетический анализ методом Neighbor Joining с моделью Kimura 2-Parameter подтвердил единство эволюционной истории всех вариаций, при этом узлы с поддержкой от 85 до 95 % указывали на четкое разделение генов на кластеры по профилю полиморфизмов. В ConSurf ключевые позиции полиморфизма TGFB1 G915C и STAT4 rs7574865 получили максимальные оценки консервации (8–9 баллов) и низкую энтропию (< 0,4), что свидетельствует об их неизменности в популяции и критическом функциональном значении. Частотный анализ по данным 1000 Genomes и gnomAD показал, что риск-аллель C в TGFB1 встречается в среднем у 12 % европейцев и 18 % азиатов, а риск-аллель T в STAT4 rs7574865 — у 15 и 22 % соответственно, что отражает возможный этнический компонент предрасположенности к фиброзу. Анализ регуляторных эффектов через RegulomeDB и Human Splicing Finder выявил, что оба SNP влияют на связывание транскрипционных факторов SMAD и STAT, а также на сплайсинг мРНК, что может модулировать уровни экспрессии профибротических медиаторов. Расчет термодинамических параметров (GC-содержание, Tm, ΔG) для фланкирующих праймерных областей с помощью OligoCalc и Primer3 показал оптимальные диапазоны (GC 55 %, Tm 58–62 °C), что обеспечивает специфичность и эффективность амплификации. В результате отобраны 14 праймерных пар, покрывающих каждую вариацию в пределах 200–250 п. н., готовых к экспериментальной валидации.

Выводы

Выбранные генетические маркеры демонстрируют высокую функциональную значимость и консервацию, что подтверждает их пригодность для создания прогностической панели фиброза у мужчин с кавернозным и системным склерозом. Частотный и регуляторный анализ указывает на реальные этнические различия в распространенности риск-аллелей, что важно учитывать при интерпретации результатов. Подобранные праймеры обеспечивают надежную детекцию ключевых SNP и могут быть интегрированы в предоперационные тест-системы, позволяя персонализировать имплантационную тактику, снизить риск осложнений и улучшить восстановление эректильной функции.

Литература

1. Crespo R. E. F. et al. Penile fibrosis—still scarring urologists today: a narrative review // Translational Andrology and Urology. 2024. Vol. 13, No. 1. P. 127.

2. Aversa A. et al. Penile involvement in systemic sclerosis: new diagnostic and therapeutic aspects // International journal of rheumatology. 2010. Vol. 2010, No. 1. P. 708067.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-355

АНАЛИЗ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ДНК-АПТАМЕРОВ К ФНО-α НА *IN VITRO* МОДЕЛИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА *

ANALYSIS OF THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF TNF-α-SPECIFIC DNA APTAMERS USING AN *IN VITRO* MODEL OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Д. В. Риппинен[1], М. А. Воробьева[2], А. О. Соловьева[1], М. А. Королев[1]

[1]*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*
[2]*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

D. V. Rippinen[1], M. A. Vorobyeva[2], A. O. Solovieva[1], M. A. Korolev[1]

[1]*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ d@rippinen.ru

Аннотация

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся прогрессирующим воспалением и деструкцией суставов, опосредованными ФНО-α. В работе исследована возможность использования ДНК-аптамеров, специфичных к ФНО-α, для подавления провоспалительной активности на линиях фибробластоподобных синовиоцитов пациентов с РА. Эффективность оценивали по их способности ингибировать ФНО-α-индуцированную секрецию ИЛ-6 и ММП-13.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by progressive inflammation and destruction of joints mediated by TNF-α. The paper investigated the possibility of using DNA aptamers specific to TNF-α to suppress proinflammatory activity on fibroblast-like synoviocyte lines in patients with RA. The effectiveness was assessed by their ability to inhibit TNF-alpha-induced secretion of IL-6 and MMP-13.

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое иммуновоспалительное ревматическое заболевание с прогрессирующей деструкцией суставов и поражением внутренних органов. В настоящее время продолжается поиск новых таргетных препаратов для лечения этого распространенного заболевания.

Ключевую роль в патогенезе РА играет провоспалительный цитокин ФНО-α, а первичным участком воспаления является синовиальная оболочка. ФНО-α индуцирует синтез ИЛ-6 фибробластоподобными синовиоцитами через активацию NF-κB, инициируя каскад реакций, усиливающий воспаление, пролиферацию синовиальной оболочки и деструкцию хряща. Поэтому мы рассматривали уровень секреции ИЛ-6 в качестве ключевого маркера функциональной активности фибробластоподобных синовиоцитов и их ответа на воздействие ФНО-α.

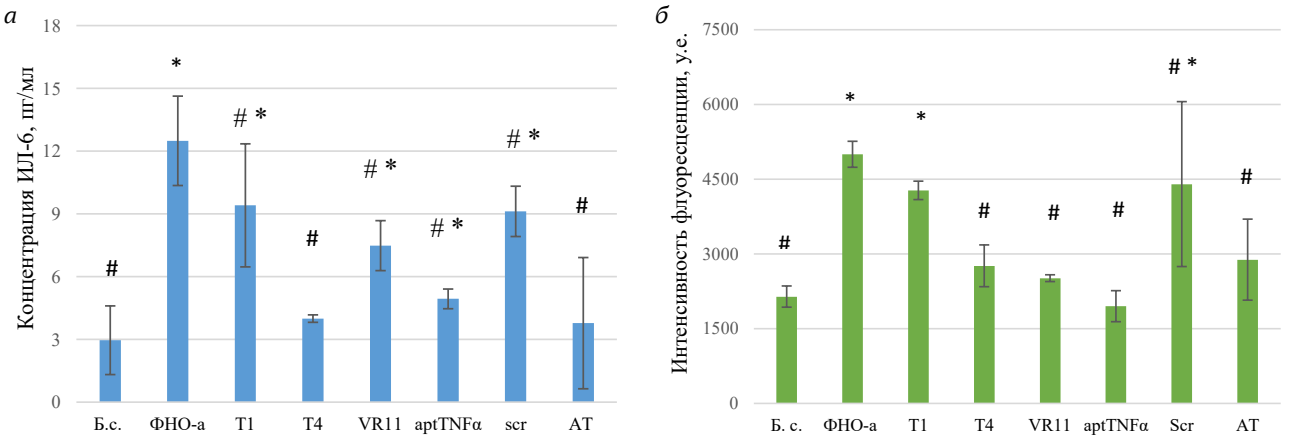
Линии первичных фибробластоподобных синовиоцитов были получены из синовиальной оболочки пациентов с РА. По уровню базовой секреции ИЛ-6 они разделялись на высокосекретирующие (2478,95 ± 1399,6 пг/мл), средне- (407,0 ± 129,9 пг/мл) и низкосекретирующие (8,0–9,2 пг/мл). Для сравнения, дермальные фибробласты секретировали минимальные количества ИЛ-6 (0,27–0,5 пг/мл). Воспалительная среда индуцировала экспрессию ММП-13 и ММП-14 в ФПС. При добавлении моноклонального антитела к ФНО-α цертолизумаба (терапевтический препарат Симзия®) наблюдали выраженное ингибирование продукции матриксных металлопротеиназ (ММП), что подтверждало терапевтическую эффективность анти-ФНО-α-терапии через ингибирование ММП. При добавлении в культуральную среду провоспалительных факторов скорость пролиферации ФПС возрастала в 1,35 раза, что свидетельствовало об их высокой чувствительности к воспалительным стимулам. Отмечено, что миграционная активность фибробластоподобных синовиоцитов коррелировала с уровнем активности заболевания у доноров. В частности, у пациентов с умеренной степенью активности заболевания миграционная способность ФПС была достоверно выше по сравнению с пациентами с низкой активностью РА. Стимуляция ФНО-α (50 нг/мл) и синовиальной жидкостью усиливала миграцию ФПС на 30 ± 15 %. Полученные результаты демонстрируют достоверные различия функциональной активности фибробластоподобных синовиоцитов и дермальных фибробластов. Наибольшую значимость представляли линии ФПС 3–5-го пассажа, поскольку они сохраняли патологический фенотип, характерный для ревматоидного артрита, и чувствительность к ФНО-α.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00363).

© Д. В. Риппинен, М. А. Воробьева, А. О. Соловьева, М. А. Королев, 2025

Для подавления активности ФНО-α использовали ДНК-аптамеры (aptTNFα [1], T1, T4 [2], VR11 [3]), несущие дополнительную 3′-модификацию (остаток тимидина через 3′-3′-фосфодиэфирную связь) для повышения нуклеазной устойчивости. Их терапевтическую эффективность оценивали по влиянию на жизнеспособность клеток и ингибированию провоспалительных каскадов.

Аптамеры не проявляли цитотоксичности и не интернализировались в клетки. Наибольшую эффективность продемонстрировали аптамеры T4 и aptTNFα, которые снижали секрецию ИЛ-6 до 3,6 ± 0,1 и 4,9 ± 0,3 пг/мл соответственно, что сопоставимо с действием цертолизумаба (3,1 ± 1,2 пг/мл) (см. рисунок). Аптамеры T4 и VR11 значимо подавляли секрецию ММП-13. Полученные результаты говорят о потенциальной способности аптамеров T4, aptTNFα и VR1 подавлять воспалительную реакцию и блокировать деструктивные процессы в хрящевой ткани, что делает их перспективными таргетными терапевтическими молекулами.



Определение противовоспалительной активности ДНК-аптамеров к ФНО-α: *а* — уровень индуцируемой ФНО-α секреции ИЛ-6 фибробластоподобными синовиоцитами; *б* — уровень индуцируемой ФНО-α секреции ММП-13 фибробластоподобными синовиоцитами. Б. с. — базовая секреция; T1, T4, VRII, aptTNFa — аптамеры к ФНО-α; Scr — контрольный олигонуклеотид; АТ — антитела к ФНО-α (Симзия 200 мг/мл); * — $p \leqslant 0{,}01$ при сравнении с уровнем базовой секреции; # — $p \leqslant 0{,}01$ при сравнении с индуцируемой ФНО-α секрецией

Литература

1. Lai W.Y. et al. A novel TNF-α-targeting aptamer for TNF-α-mediated acute lung injury and acute liver failure // Theranostics. Ivyspring International Publisher, 2019. Vol. 9, No. 6. P. 1741–1751.

2. Mashayekhi K., Ganji A., Sankian M. Designing a new dimerized anti human TNF-α aptamer with blocking activity // Biotechnol Prog. John Wiley and Sons Inc. 2020. Vol. 36, No. 4.

3. Orava E.W. et al. A short DNA aptamer that recognizes TNF-alpha and blocks its activity in vitro. 2012.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-356

ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПОСЛЕ ОБШИРНЫХ ТОРАКОАБДОМИНАЛЬНЫХ ОПЕРАЦИЙ

INSULIN RESISTANCE FOLLOWING MAJOR THORACOABDOMINAL SURGERIES

Н. В. Саввинова[1], И. А. Тарасова[1,2]

[1]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*
[2]*Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва*

N. V. Savvinova[1], I. A. Tarasova[1,2]

[1]*I. M. Sechenov First Moscow State Medical University*
[2]*Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow*

✉ savvinova.natalia0108@gmail.com

Аннотация

Инсулинорезистентность после хирургических вмешательств представляет собой феномен транзиторного изменения чувствительности тканей к действию инсулина в ответ на хирургическую агрессию. В рамках данной работы мы изучили развитие инсулинорезистентности после обширных торакоабдоминальных операций в ближайшем и отдаленном периоде наблюдения.

Abstract

Insulin resistance following surgical interventions is a phenomenon characterized by a transient change in tissue sensitivity to insulin in response to surgical stress. In this study, we examined the development of insulin resistance after extensive thoracoabdominal operations in both the early postoperative period and at longer-term follow-up.

Инсулинорезистентность (ИР) — эволюционно сформировавшаяся реакция организма на стресс, при котором физиологические дозы инсулина не обеспечивают его биологические эффекты [1, 2]. Повышение ИР при усилении метаболической активности регулирует синтез АТФ, преимущественно используя углеводы и жиры. При снижении эффективности этих процессов (например, голод, стресс, хирургическое вмешательство) организм привлекает белки для производства энергии, нарушая метаболический баланс [3].

Послеоперационная ИР может быть обусловлена блокадой действия инсулина на пререцепторном и пострецепторном уровнях (см. рисунок). Это снижает анаболизм, фосфорилирование глюкозы, выработку энергии и гипогликемическое действие инсулина, вызывая гипергликемию, метаболические и функциональные нарушения, включая стрессовую гипергликемию и потерю мышечного белка [3]. ИР после операции обычно транзиторна, но может сохраняться до 3 недель [4].

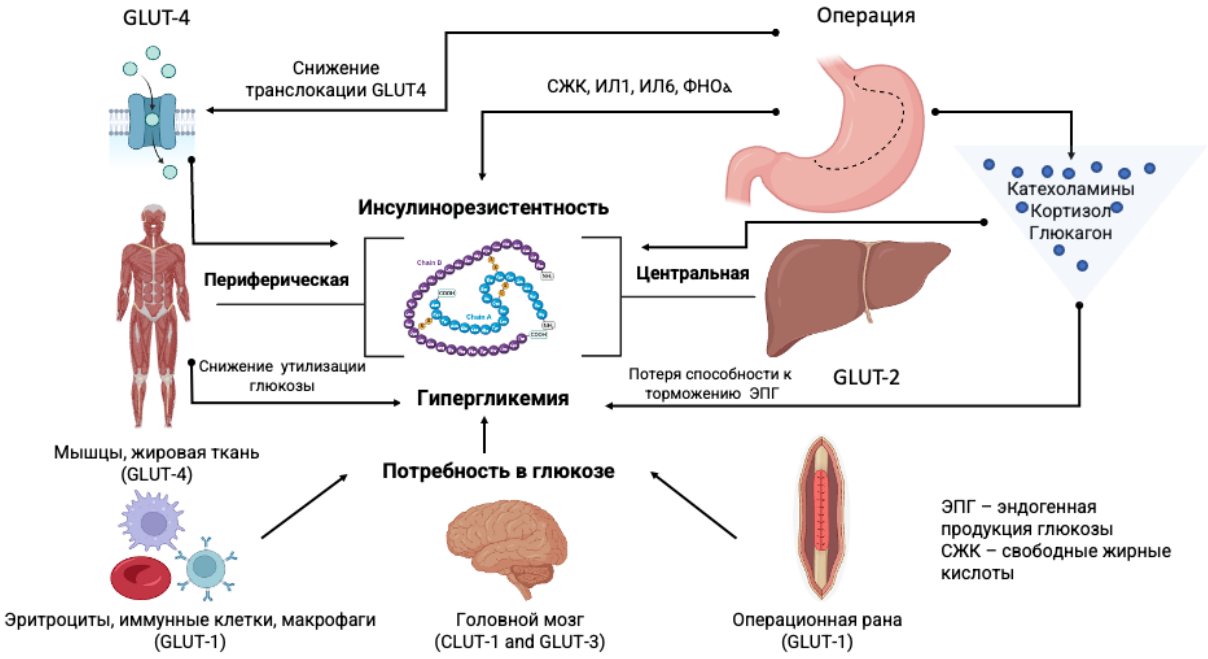
Цель исследования — изучить развитие ИР у пациентов после обширных торакоабдоминальных операций в раннем и отдаленном периодах.

Материалы и методы

В отделении торакоабдоминальной хирургии и онкологии ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б. В. Петровского» проведено изучение ИР при обширных торакоабдоминальных операциях (торакоскопическая и открытая резекция пищевода, загрудинная пластика пищевода сегментом толстой кишки, гастрэктомия).

В исследование были включены 40 пациентов, которые были распределены на три группы в зависимости от объема хирургического вмешательства: пациенты группы ТСРП (n = 13) перенесли торакоскопическую субтотальную резекцию пищевода (СРП) с одномоментной пластикой, пациентам группы ОСРП была выполнена открытая операция (n = 12), в группе БСРП (n = 15) СРП не выполнялась. Критерием невключения был сахарный диабет и/или гипергликемия натощак, критерием исключения — исходная ИР (индекс HOMA-IR > 2,7). Уровни глюкозы и инсулина (с вычислением индекса ИР HOMA-IR) были измерены до и в течение 3 недель после операции (в 1, 7, 14 и 21-е сутки). Различия считались статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

© Н. В. Саввинова, И. А. Тарасова, 2025



Патогенез развития послеоперационной инсулинорезистентности

Результаты

Группы были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела, длительности госпитализации и исходам. Статистически значимых различий в уровне гликемии до и после операции в группах не выявлено. Уровень инсулина и значение индекса HOMA-IR в группе БСРП был почти в 2 раза ниже по сравнению с ТСРП и ОСРП на всех точках контроля, что было статистически значимо ($p < 0{,}001$). В первые послеоперационные сутки ИР (HOMA-IR > 2,7) была выявлена у 42,5 % больных, из них у 83 % пациентов в группе ОСРП, у 39 % в группе ТСРП и только у 13 % пациентов группы БСРП, $p < 0{,}001$. На 21-й послеоперационный день в группе БСРП у всех больных восстановлена чувствительность к инсулину, в то время как в группе ТСРП ИР сохранялась у 15 %, а в группе ОСРП — у 25 % больных.

Выводы

Более 40 % больных после торакоабдоминальных операций имеют ИР. При обширных хирургических операциях, включающих субтотальную резекцию пищевода, ИР после операции значительно выражена и сохраняется более 3 недель.

Литература

1. Шестакова М. В., Брескина О. Ю. Инсулинорезистентность: патофизиология, клинические проявления, подходы к лечению // Consilium Medicum. 2002. Т. 4, № 10. С. 523–527.

2. Thorell A., Nygren J., Ljungqvist O. Insulin resistance: a marker of surgical stress // Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 1999. Vol. 2, No. 1. P. 69–78.

3. Liu B., Wang Y., Liu S. et al. A randomized controlled study of preoperative oral carbohydrate loading versus fasting in patients undergoing elective craniotomy // Clinical Nutrition. 2019. Vol. 38, No. 5. P. 2106–2112.

4. Thorell A., Efendic S., Gutniak M. et al. Insulin resistance after abdominal surgery // British Journal of Surgery. 1994. Vol. 81, No. 1. P. 59–63.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-357

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИЙ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ ЭРЕКТИЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КРЫС НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

THE POSSIBILITY OF USING BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN RATS WITH ERECTILE DYSFUNCTION AND DIABETES MELLITUS

А. Е. Салопонова, А. А. Матичина, Н. М. Фаустова, М. Н. Макарова

АО «Научно-производственное объединение „Дом Фармации“», Ленинградская область

A. E. Saloponova, A. A. Matichina, N. M. Faustova, M. N. Makarova

Research and Manufacturing Company "Home of Pharmacy" JSC, Leningrad Oblast

✉ saloponova.ae@doclinika.ru

Аннотация

Представлены результаты изменений биомаркеров нарушения функции эндотелия в крови и в тканях кавернозного тела у самцов крыс при моделировании патологии эректильной дисфункции на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Получены статистически и клинически значимые изменения по параметрам: количество стабильных метаболитов оксида азота, активность общей NO-синтазы, концентрация продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Abstract

The results of changes in biomarkers of endothelial dysfunction in the blood, tissues of the cavernous body in male rats are presented when modeling the pathology of erectile dysfunction on streptozotocin-induced diabetes mellitus background. Statistically and clinically significant changes in the parameters were obtained: amount of stable nitric oxide metabolites, activity of total NO synthase, concentration of products reacting with thiobarbituric acid.

Эректильная дисфункция (ЭД) по данным различных исследований сопровождает течение сахарного диабета (СД) у 20–85 % мужчин. [1]. Для подтверждения диагноза у человека используют инструментальные методы и определение концентрации тестостерона. Для доклинических исследований необходимы дополнительные биомаркеры, подтверждающие формирование патологии и позволяющие оценить фармакологическую активность лекарственных средств.

Одной из причин формирования ЭД на фоне СД являются вторичные патологии, связанные с эндотелиальной дисфункцией, которые можно оценить с помощью количества стабильных метаболитов оксида азота (СМОА) и активности общей NO-синтазы (NOS, ЕС 1.14.13.39), и развитием окислительного стресса, оцениваемого по концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [1–3].

Динамика и возможность использования данных показателей в качестве биомаркеров у крыс при моделировании ЭД на фоне СД недостаточно изучена.

Цель работы — оценка возможности использования биомаркеров нарушения функции эндотелия в крови и тканях кавернозного тела у крыс при моделировании ЭД на фоне стрептозотоцин-индуцированного СД.

Методы

Исследование проводили на половозрелых сексуально опытных самцах крыс линии Wistar в возрасте 10–12 недель. СД моделировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 65 мг/кг. Критериями развития СД являлись содержание глюкозы в крови не менее 10 ммоль/л, гликозилированного гемоглобина — более 3,81 %, критерием развития ЭД — уровень тестостерона в крови не более 3,8 нмоль/л на 64-й день эксперимента. Было сформировано 2 группы — контрольная (n = 15) и с патологией (n = 13). Для подтверждения формирования эндотелиальной дисфункции на 64-й день у 3 самцов из каждой группы, отобранных случайным образом, анализировали количество СМОА, активность NOS и антиоксидантный статус. Далее отбор биоматериала проводили на 86-й день у половины животных из каждой группы и на 107-й день — у оставшихся.

Концентрацию тестостерона определяли иммуноферментным методом анализа (Тестостерон-ИФА-Бест, № Х3972, «Вектор-Бест», Россия), активность NOS — колориметрическим энзиматическим методом (Nitric Oxide Synthase Activity Assay Kit (Colorimetric), ab211083, Abcam, США), спектрофотометрическим методом определяли концентрацию СМОА [4], ТБК РП [5].

© А. Е. Салопонова, А. А. Матичина, Н. М. Фаустова, М. Н. Макарова, 2025

Результаты

На фоне экспериментальной патологии у животных отмечали: снижение концентрации тестостерона на всех контрольных точках, выраженное снижение количества СМОА в крови и тканях пениса в среднем в 1,5 и 2 раза соответственно, активности общей NOS в 2–4 раза, повышенное содержание ТБК-РП в тканях пениса на протяжение всего эксперимента (см. таблицу).

Значения биомаркеров при моделируемой патологии, M ± SD[A]

Гр. №	*n*	В крови		В тканях пениса		
		Тестостерон, нмоль/л	СМОА, нмоль/мл	СМОА, нмоль/г	Общая NOS, мМЕ/г	ТБК-РП, нмоль/г
64-й день						
1	3	4,52 ± 3,62	277 ± 11	689 ± 156	47,0 ± 8,7	72,8 ± 48,1
2	3	1,79 ± 1,65	170 ± 25[B]	270 ± 37[B]	11,2 ± 1,6[B]	535,5 ± 30,4[B]
86-й день						
1	6	4,08 ± 0,709	284 ± 52	979 ± 140	48,1 ± 4,1	198,7 ± 41,4
2	5	1,36 ± 0,58[B]	196 ± 46	509 ± 160	28,6 ± 7,4	248,3 ± 36,4
107-й день						
1	6	5,31 ± 2,63[C]	167 ± 29	886 ± 25	47,6 ± 9,0	287,9 ± 39,8
2	5	1,44 ± 0,44[B]	117 ± 27[B]	485 ± 39[B]	13,4 ± 4,3[B]	414,8 ± 53,9

Примечание:

A — данные соответствовали закону нормального распределения (критерий Шапиро — Уилка, $p > 0,05$);

B — статистически значимые отличия от интактной группы (*t*-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

C — исключено значение 19,9 нМ.

Выводы

При моделировании ЭД на фоне стрептозотоцин-индуцированного СД у крыс установлено изменение уровней СМОА в крови и тканях пениса, активности NOS и ТБК-РП в тканях пениса, что подтверждает нарушения функций эндотелия и возможность использования этих показателей в качестве биомаркеров рассматриваемой патологии.

Литература

1. Jumani D. K., Patil O. Erectile dysfunction in diabetes mellitus: A review // Journal of Diabetology. 2020. Vol. 11. P. 1–7.

2. Борисов В. В. Эректильная дисфункция при заболеваниях внутренних органов: обзор данных литературы // Эффективная фармакотерапия. 2018. № 29. С. 34–39.

3. Defeudis G. et al. Erectile dysfunction and diabetes: a melting pot of circumstances and treatments // Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 2022. Vol. 38, No. 2. P. e3494.

4. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 6. С. 15–18.

5. Pozharitskaya O. N. et al. Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis from Barents Sea // Journal of Functional Foods. 2015. Vol. 17. P. 227–234.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-358

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К САХАРНОМУ ДИАБЕТУ 1-ГО ТИПА У НАСЕЛЕНИЯ ХМАО-ЮГРЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОРЕСУРСНЫХ КОЛЛЕКЦИЙ*

GENETIC PREDISPOSITION TO TYPE 1 DIABETES IN THE POPULATION OF THE KHANTY-MANSIYSK AUTONOMOUS OKRUG — YUGRA: RESULTS OF A MOLECULAR GENETIC STUDY OF BIORESOURCE COLLECTIONS

М. Л. Сафронова, А. В. Морозкина, М. Ю. Донников, Л. В. Коваленко

Сургутский государственный университет

M. L. Safronova, A. V. Morozkina, M. Yu. Donnikov, L. V. Kovalenko

Surgut State University

✉ safrononva_ml@surgu.ru

Аннотация

На базе биоресурсных коллекций «Эндокринная патология» и «Популяционная генетика» авторами проанализирована частота HLA-гаплотипов и их связь с развитием сахарного диабета 1-го типа (СД1) в трех группах населения, различных по этническому составу и статусу заболевания, постоянно проживающих на территории ХМАО-Югры.

Abstract

Based on the bioresource collections “Endocrine Pathology” and “Population Genetics”. The authors analyzed the frequency of HLA haplotypes and their association with the development of type 1 diabetes mellitus (DM1) in three population groups, different in ethnic composition and the DM1 status, permanently residing in the territory of Khanty-Mansi Autonomous Okrug-Yugra.

На территории ХМАО-Югры фиксируется рост заболеваемости сахарным диабетом 1-го типа среди населения. В 2024 г. зарегистрировано 3184 случая, что превышает показатель предыдущего года на 112 человек [1, 2]. Наряду с этим, сохранение коренных малочисленных народов (аборигенных для ХМАО-Югры популяций ханты и манси) представляет собой проблему, требующую комплексного подхода.

HLA-типирование является эффективным методом обнаружения генетических маркеров предрасположенности к СД1 и его профилактики. Для реализации генетических исследований заболевания на базе лаборатории «Биобанк Югры» Сургутского государственного университета (СурГУ) были сформированы коллекции образцов биоматериала «Эндокринная патология» и «Популяционная генетика».

Целью данной работы являлось выявление частот полиморфных аллелей и гаплотипов в локусах генов *HLA-DQA1, DQB1* и *DRB1* системы HLA II класса у коренного малочисленного народа ханты и пришлого населения, постоянно проживающих на территории ХМАО-Югры.

В исследовании приняли участие группы коренного (60 человек), условно здорового пришлого населения (54 человека) и больных СД1 из пришлого населения (45 человек). Геномную ДНК выделяли набором «Проба-рапид-генетика» («ДНК-Технология», Россия). Генотипирование HLA II класса (DQA1, DQB1, DRB1) проводили методом ПЦР в режиме реального времени на термоциклере «ДТпрайм 5». Статистический анализ включал расчет относительной частоты встречаемости аллелей и гаплотипов, а также относительного риска. Для оценки значимости различий использовали критерий χ^2 при $p \leqslant 0,05$.

Проведенное исследование частот встречаемости аллелей HLA II класса у хантов показало статистически значимые различия в аллелях *DQA1*01:02/03* (частота 0,250 при $p = 0,013$ и 0,225 при $p = 0,035$ соответственно)*; DQB1*02* (0,125 при $p = 0,004$)*; *03:02* (0,050 при $p = 0,026$); **05:02/04* (0,008 при $p = 0,005$); **06:02-8* (0,467 при $p = 0,010$)*; DRB1*03* (0,025 при $p = 0,007$); **04* (0,042 при $p = 0,002$); **12* (0,067 при $p = 0,024$); **13* (0,275 при $p = 0,001$); **15* (0,225 при $p = 0,009$); **16* (0,008 при $p = 0,019$) по сравнению с группой условно здорового пришлого населения.

Сравнительный анализ частот изучаемых аллелей, гаплотипов и их комбинаций между представителями пришлого населения, условно здоровыми и больными СД1, показал значимые различия по локу-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-574-05.

© М. Л. Сафронова, А. В. Морозкина, М. Ю. Донников, Л. В. Коваленко, 2025

сам *DQA1*01:02/03* (χ^2 = 12,46 при p = 0,001 и χ^2 = 4,23 при p = 0,040 соответственно); **03:01* (χ^2 = 4,02 при p = 0,045); *DQB1*06:02-8* (χ^2 = 4,23 при p = 0,040); *DRB1*07* (χ^2 = 4,11 при p = 0,043). Сравнение частот гаплотипов у хантов с группой условно здорового пришлого населения выявило статистически значимую низкую частоту встречаемости гаплотипов, ассоциированных с высоким и умеренным риском развития СД1 (DR4~DQ8 — χ^2 = 6,33 при p = 0,001; DR3~DQ2 — χ^2 = 7,38 при p = 0,007), и высокую частоту «защитных» гаплотипов DQ6~DR15 (χ^2 = 16,67 при p = 0,001), DQ6~DR13 (χ^2 = 12,17 при p = 0,001). Результаты исследования показали, что у хантов, вероятно, есть генетические факторы, которые обеспечивают им определенную степень защиты от СД 1-го типа.

Полученные данные подчеркивают важную роль генетических факторов в низкой подверженности СД 1-го типа в группе хантов. Понимание молекулярно-генетических и эпидемиологических особенностей СД 1-го типа у малых коренных народов России необходимо для разработки новых подходов диагностики и терапии заболевания в этнически обособленных популяциях.

Литература

1. Федеральный Регистр сахарного диабета РФ. URL: https://sd.diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content (дата обращения: 15.04.2023).

2. Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К. и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. // Сахарный диабет. 2023. Т. 26, № 2. С. 104–123.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-359

СВЯЗЬ УРОВНЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ С ПРОФИЛЕМ ЛИПИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

RELATIONSHIP OF URINE ACIDITY LEVEL WITH LIPID PROFILE IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE: PILOT STUDY

О. С. Сергеева, Ю. А. Котова

Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко

O. S. Sergeeva, Yu. A. Kotova

Voronezh State Medical University named after N. N. Burdenko

✉ shibanova_94@bk.ru

Аннотация

Изучена взаимосвязь между уровнем мочевой кислоты в сыворотке крови и параметрами липидного спектра у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) с целью оценки возможного вклада гиперурикемии в атерогенные метаболические изменения.

Abstract

To study the relationship between serum uric acid levels and lipid spectrum parameters in patients with coronary heart disease (CHD), in order to assess the possible contribution of hyperuricemia to atherogenic metabolic changes.

Материалы и методы

В исследование включены 48 пациентов (мужчин — 28, женщин — 20) в возрасте от 45 до 74 лет (средний возраст 61,3 ± 7,8 года) с подтвержденным диагнозом стабильной стенокардии II–III ФК. Проводилось лабораторное обследование, включающее биохимический анализ крови с определением мочевой кислоты, общего холестерина (ОХ), липопротеинов высокой (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов (ТГ). Пациенты были разделены на две группы: нормоурикемия (n = 26, уровень мочевой кислоты 314 ± 35 мкмоль/л) и гиперурикемия (n = 22, 437 ± 46 мкмоль/л). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 13.0, применялись критерий Манна — Уитни и коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты

У пациентов с ИБС показатели липидного спектра различались в зависимости от уровня мочевой кислоты. В группе с нормоурикемией (n = 26) уровень мочевой кислоты составлял 314 ± 35 мкмоль/л, общий холестерин — 5,2 ± 0,7 ммоль/л, липопротеины низкой плотности (ЛПНП) — 3,2 ± 0,6 ммоль/л, липопротеины высокой плотности (ЛПВП) — 1,2 ± 0,2 ммоль/л, триглицериды — 1,6 ± 0,5 ммоль/л. В группе с гиперурикемией (n = 22) уровень мочевой кислоты был выше — 437 ± 46 мкмоль/л. При этом показатели липидного обмена также были изменены: общий холестерин составлял 5,9 ± 0,8 ммоль/л, ЛПНП — 3,9 ± 0,7 ммоль/л, ЛПВП — 1,0 ± 0,2 ммоль/л, триглицериды — 2,1 ± 0,4 ммоль/л. Примечание: значения представлены в виде средних стандартных отклонений (±). Корреляционный анализ выявил статистически значимые связи между уровнем мочевой кислоты и параметрами липидного профиля: положительная корреляция с ЛПНП (r = 0,48; p < 0,01) и триглицеридами (r = 0,42; p < 0,05), отрицательная — с ЛПВП (r = –0,39; p < 0,05).

Выводы

Результаты пилотного исследования указывают на статистически значимую ассоциацию между гиперурикемией и неблагоприятными параметрами липидного профиля у пациентов с ИБС. Повышение уровня мочевой кислоты ассоциировано с увеличением концентраций ЛПНП и триглицеридов, а также снижением уровня ЛПВП. Полученные данные подчеркивают целесообразность включения оценки уровня мочевой кислоты в клинический алгоритм стратификации сердечно-сосудистого риска и индивидуализации гиполипидемической терапии.

© О. С. Сергеева, Ю. А. Котова, 2025

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-360

ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ PKC И PI3K ПРИ НАГРЕВЕ НА КОЛЕБАНИЯ КАЛЬЦИЯ И СКОРОСТИ НАРАБОТКИ ОКСИДА АЗОТА В ЦИТОПЛАЗМЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КОЖИ МЫШИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ *

INFLUENCE OF PKC AND PI3K INHIBITORS DURING HEATING ON CALCIUM AND NITRIC OXIDE GENERATION RATE OSCILLATION IN THE CYTOPLASM OF CULTURED MOUSE SKIN ENDOTHELIOCYTES IN HYPERGLYCEMIC CONDITIONS

М. С. Сидорова[1,2], А. Р. Дюкина[2], С. Н. Мякишева[2], А. А. Гриневич[2], Д. А. Серов[3]

[1]Пущинский филиал Российского биотехнологического университета
[2]Институт биофизики клетки РАН, Пущино
[3]Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва

M. S. Sidorova[1,2], A. R. Dukina[2], S. N. Myakisheva[2], A. A. Grinevich[2], D. A. Serov[3]

[1]Pushchino branch of the Russian Biotechnology University
[2]Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino
[3]Institute of General Physics named after A. M. Prokhorov RAS, Moscow

✉ marya.yase@yandex.ru

Аннотация

Эндотелиальная дисфункция приводит к сосудистым осложнениям при сахарном диабете. Функционирование этих клеток характеризуется колебаниями $[Ca^{2+}]_i$ и $d[NO]_i$. Исследованы эндотелиоциты кожи мыши в нормо- и гипергликемии (НГ, ГГ), при тепловой пробе 40 °C, с ингибиторами PKC и PI3K (GF, TG). Обнаружено снижение энергии колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $d[NO]_i$ под действием TG при ГГ. Повышение температуры усиливало эффект снижения энергии колебаний $d[NO]_i$ с GF и TG при НГ и $[Ca^{2+}]_i$ для TG при ГГ.

Abstract

Endothelial dysfunction leads to vascular complications of diabetes mellitus. The functioning of these cells is characterized by oscillation of $[Ca^{2+}]_i$ and $d[NO]_i$. Mouse skin endothelial cells were studied under normoglycemic (NG) and hyperglycemic (HG) conditions, during a heat test 40 °C, and in the presence of PKC and PI3K inhibitors (GF and TG). A decrease in the energy of $[Ca^{2+}]_i$ and $d[NO]_i$ oscillations was detected under the influence of TG in HG. Increasing the temperature intensified the reduction in the energy of $d[NO]_i$ oscillations for both GF and TG in NG, and of $[Ca^{2+}]_i$ oscillation for TG in HG.

Гипергликемия — одно из осложнений сахарного диабета (СД), хронического заболевания, характеризуемого высоким содержанием глюкозы в крови, возникающим вследствие недостаточной выработки инсулина поджелудочной железой, или инсулинорезистентностью клеток тканей организма. Увеличение количества заболеваний СД в мире сравнивают с пандемией. Так, метаболические нарушения при СД, приводящие к гипергликемии и хроническому воспалению, считаются одной из основных причин микрососудистых осложнений. В их развитии ключевую роль играет модификация функций эндотелиальных клеток (эндотелиоцитов). Работа эндотелиоцитов характеризуется изменениями концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и скорости наработки оксида азота ($d[NO]_i$), которые носят колебательный характер. При этом спектральные характеристики и энергии этих колебаний служат индикатором функционального состояния эндотелиоцитов, меняющегося при гипергликемии и при повышении температуры, связанной, например, с воспалительными процессами.

Цель работы — оценить эффект ингибиторов PKC и PI3K при нагреве на энергию колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $d[NO]_i$ в культивируемых эндотелиоцитах кожи мыши в условиях гипергликемии.

Исследования осуществлялись на культивируемых эндотелиоцитах микрососудов мыши с моделированием гипергликемических условий СД *in vitro*. Контролем были нормогликемические клетки. Для нормо- и гипергликемических условий клетки инкубировали в течение 24 ч в среде для культивирования клеток с содержанием D-глюкозы в концентрациях 5,5 и 22 мМ соответственно. За 10 мин и 1 ч до проведения эксперимента добавлялись ингибиторы GF (109203X ингибирует PKC — протеинкиназу C) и TG (100713 ингибирует PI3K — фосфоинозитид-3-киназу) в концентрациях 1 и 10 мкМ соответственно. В качестве контроля брались клетки без добавлений ингибиторов. После 15 мин покоя (37 °C) после начала эксперимента проводили тепловую пробу (нагрев

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00215П).
© М. С. Сидорова, А. Р. Дюкина, С. Н. Мякишева, А. А. Гриневич. Д. А. Серов, 2025

до 40 °C), которая длилась 20 мин. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ и $d[NO]_i$ определяли методом флуоресцентной микроскопии. Для анализа изображений использовалось программное обеспечение ImageJ. Спектры и энергии колебаний вычисляли с помощью вейвлет-преобразования и интегрирования квадрата амплитуды соответственно, в частотном диапазоне эндотелиального ритма кожной микроциркуляции 0,007–0,021 Гц.

Показано достоверное снижение энергии колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $d[NO]_i$ при добавке TG по сравнению с контролем для гипергликемических условий и обеих температур. Увеличение температуры приводило к достоверному снижению по сравнению с покоем энергии колебаний $d[NO]_i$ для обоих ингибиторов при нормогликемии и $[Ca^{2+}]_i$ для TG при гипергликемии. Таким образом, показан вклад двух киназных путей (PKC и PI3K) в регуляцию колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $d[NO]_i$ в эндотелиоцитах микрососудов кожи мыши при увеличении температуры в гипергликемических условиях. Это может быть полезным для понимания развития метаболических нарушений в регуляции периферического кровотока у больных сахарным диабетом.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-361

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ *

STUDY OF CYTOKINE PROFILE IN CARDIAC SURGERY PATIENTS

М. В. Силина, Д. Ш. Джалилова, М. А. Диатроптова, О. О. Гринь, М. А. Бабаев, О. В. Макарова

Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва

M. V. Silina, D. Sh. Dzhalilova, M. A. Diatroptova, O. O. Grin, M. A. Babaev, O. V. Makarova

Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow

✉ marusyasilina99@yandex.ru

Аннотация

На третьи сутки после операции по поводу расслаивающей аневризмы аорты увеличение уровней экспрессии *IL6* и *IL10*, а также содержание IL-1β, IL-6 и IL-10 в сыворотке крови наблюдается у всех пациентов, однако при развитии инфекционно-воспалительных осложнений эти показатели выше.

Abstract

On the third day after surgery for dissecting aortic aneurysm, an increase in the *IL6* and *IL10* expression levels, as well as the IL-1β, IL-6 and IL-10 content in the blood serum is observed in all patients, but in the presence of infectious and inflammatory complications, these parameters are higher.

Доля инфекционно-воспалительных осложнений, возникающих после кардиохирургических операций, составляет 4,9–30,8 %, что приводит к увеличению сроков госпитализации и затрат на лечение, а также может быть причиной отсроченных неблагоприятных исходов при диагностировании после выписки пациента из стационара [1]. В литературе пока не представлены конкретные биомаркеры, позволяющие охарактеризовать молекулярно-биологические процессы, лежащие в основе индивидуальных особенностей развития системной воспалительной реакции, однако имеется большое количество биомаркеров сепсиса, коррелирующих с исходом заболевания у пациентов отделений интенсивной терапии [2]. К этим биомаркерам относят около 1000 молекул, однако на ранних этапах развития синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), до появления его клинических симптомов, они не позволяют предсказать риск развития инфекционно-воспалительных осложнений. Основным регулятором клеточного ответа на воспаление является ядерный фактор каппа B (NF-κB), индуцирующий продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и IL-10 [3].

Цель — оценить уровни экспрессии мРНК *NFKB1*, *IL1B*, *IL6* и *IL10* в лейкоцитах периферической крови, а также содержание IL-1β, IL-6 и IL-10 в сыворотке у кардиохирургических пациентов до и через 72 ч после операций по поводу расслаивающей аневризмы аорты.

Исследование проведено с использованием образцов крови 51 кардиохирургического пациента мужского пола в возрасте от 20 до 72 лет с расслаивающей аневризмой аорты. Инфекционно-воспалительные осложнения (внутрибольничная пневмония, инфекция области хирургического вмешательства, инфекция мочевыводящих путей) после операций наблюдались у 16 пациентов. Для проведения исследования с использованием образцов крови человека было получено разрешение локальной этической комиссии, а также письменное добровольное информированное согласие от пациентов в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2013) с изменениями от 2024 г. Венозную кровь забирали до операции и через 72 ч после нее. Уровни экспрессии мРНК *NFKB1*, *IL1B*, *IL6* и IL10 в клетках периферической крови определяли методом ПЦР в реальном времени относительно уровня экспрессии *GAPDH*. Концентрацию белков IL-1β, IL-6 и IL-10 в сыворотке крови определяли методом ИФА. Различия между группами пациентов с осложнениями и без них оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни. Данные выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25–75 %). Различия считали статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

В дооперационном периоде уровень экспрессии *IL10* в лейкоцитах периферической крови был выше у пациентов с осложнениями в послеоперационном периоде, чем у людей без них. При этом через 72 ч уровни экс-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 123030700027-5.

© М. В. Силина, Д. Ш. Джалилова, М. А. Диатроптова, О. О. Гринь, М. А. Бабаев, О. В. Макарова, 2025

прессии *IL6* и *IL10*, а также содержание IL-1β, IL-6 и IL-10 в сыворотке крови увеличивались независимо от течения послеоперационного периода, но были выше у пациентов с инфекционно-воспалительными осложнениями.

Полученные данные свидетельствуют об активации провоспалительного ответа у всех пациентов после операций по поводу расслаивающей аневризмы аорты через 72 ч после нее, но в группе пациентов с инфекционно-воспалительными осложнениями она была более выражена.

Литература

1. Попов Д. А. Послеоперационные инфекционные осложнения в кардиохирургии // Анналы хирургии. 2013. Т. 5. С. 15–21.

2. Barichello T. et al. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review // Critical care (London, England). 2022. Vol. 26. P. 14.

3. Netea M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease // Nature Reviews Immunology. 2020. Vol. 20. P. 375–388.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-362

ПРИМЕНЕНИЕ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ОЧАГОВ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ И МОДЕЛИРОВАНИЯ ОПТИМАЛЬНОГО ПРОТОКОЛА АБЛЯЦИИ ПРИ ИНТЕРВЕНЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ *

APPLICATION OF MACHINE LEARNING TO DETECT ATRIAL FIBRILLATION FOCI AND MODEL THE OPTIMAL ABLATION PROTOCOL FOR INTERVENTIONAL TREATMENT

А. П. Синицына[1], Р. М. Биганов[2], В. А. Сыровнев[1], О. А. Сергеева[3], В. А. Цвелая[1,4]

[1]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2]*Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева, Москва*
[3]*Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского, Москва*
[4]*Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*

A. P. Sinitsyna[1], R. M. Biganov[2], V. A. Syrovnev[1], O. A. Sergeeva[3], V. A. Tsvelaya[1,4]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Bakoulev Center for Cardiovascular Surgery, Moscow*
[3]*I. V. Davydovsky City Clinical Hospital, Moscow*
[4]*Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute named after M. F. Vladimirsky*

✉ sinitsyna.ap@phystech.edu

Аннотация

Один из основных методов лечения аритмий — операция абляции — показывает недостаточную эффективность, так как более половины пациентов возвращаются на нее повторно. В данной работе продемонстрирована разработка системы тестирования протоколов абляции, в которой моделируется распространение волны возбуждения в цифровом двойнике предсердия пациента с учетом расположения участков фиброза и электрофизиологических свойств тканей.

Abstract

One of the main methods of treating arrhythmias is ablation surgery, which shows insufficient effectiveness, since more than half of patients return to it again. This paper demonstrates the development of an ablation protocol testing system, which simulates the propagation of an excitation wave in the digital twin of the patient's atrium, taking into account the location of fibrosis and the electrophysiological properties of tissues.

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются наиболее распространенной причиной смертности среди трудоспособного населения [1]. Фибрилляция предсердий (ФП) — одно из наиболее распространенных ССЗ, поражающее до 2 % взрослого населения развитых стран. Основным методом лечения является операция абляции — создание на поверхности ткани препятствий для ограничения путей возникновения аритмий. Однако показано, что более половины пациентов возвращаются на повторную операцию, так как аритмия возникает вновь в новых условиях.

Основной целью данной работы является разработка системы помощи принятия решения при выборе протокола абляции. Она сделает возможным тестирование различных протоколов абляции путем моделирования распространения волны возбуждения в предсердии пациента с учетом расположения фиброзных участков и свойств тканей. Решение данной задачи проводилось с помощью реконструирования 3-мерной формы левого предсердия на основе снимков КТ и МРТ пациента с использованием методов машинного обучения. Также по данным картирования была создана карта фиброзных структур и реконструировано распространение волны возбуждения.

Трехмерная модель левого предсердия была построена двумя способами: путем ручной сегментации МРТ-изображений с контрастом гадолиния с их последующей интерполяцией и при помощи автоматической сегментации КТ-изображений с использованием алгоритмов машинного обучения. Сегментация МРТ проводилась по трем объектам: стенка, пул крови и фиброз. Для сегментации левого предсердия вначале было сегментировано целое сердце со всеми анатомическими структурами при помощи модели глубокого обучения nnUNet [2], затем следовало картографирование сердечных подструктур. Конечным результатом алгоритма являлись 3-мерные модели предсердия пациента. Затем набор изображений переводился в данные для openCARP — среды

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Московского центра инновационных технологий в здравоохранении (грант № 1208-7).

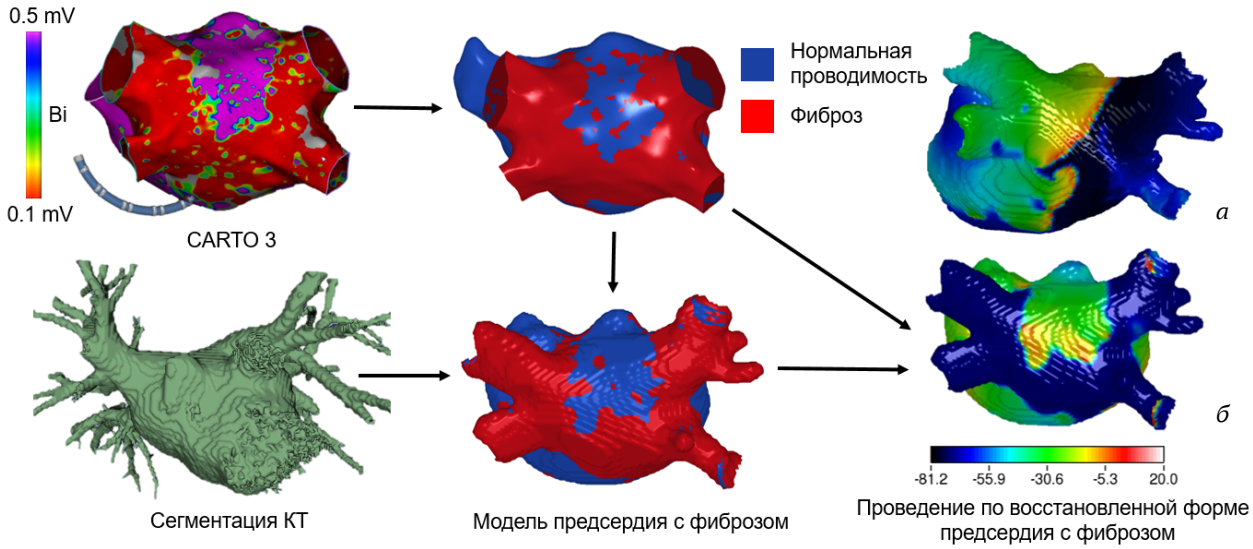
© А. П. Синицына, Р. М. Биганов, В. А. Сыровнев, О. А. Сергеева, В. А. Цвелая, 2025

для моделирования волновой динамики [3]. Для воспроизведения правильной картины распространения волн при помощи открытого инструмента AugmentA восстанавливалось направление сердечных волокон предсердия на модели КТ [4].

Следующим шагом стало восстановление участков фиброза по данным электрофизиологической навигационной системы картирования CARTO 3. Фибротические регионы восстанавливались по карте биполярного потенциала с порогом напряжения 0,45 мВ. Участки фиброза переносились на восстановленную из КТ модель предсердия пациента при помощи собственного алгоритма.

В основу проведения волны легла электрофизиологическая модель Contermanche, описывающая аритмогенные процессы в ткани предсердий [5]. Разным морфологическим структурам ткани были присвоены различные значения проводимости, основанные на экспериментальных данных.

Конечным результатом является картина проведения волн возбуждения в трехмерном предсердии с учетом расположения фиброзных участков и их электрофизиологии со значениями потенциала в каждой точке модели предсердия на протяжении времени моделирования (см. рисунок)



Схематическое представление алгоритма наложения данных электроанатомического картирования на модель КТ с последующей симуляцией проведения волны возбуждения. Представлена карта потенциала предсердия пациента до (*а*) и после (*б*) проведения операции абляции

Данное исследование имеет потенциал для внедрения в клиническую практику. Система подтвердит эффективность в реальных исследованиях, она может уменьшить время операции (предварительное моделирование оптимальных зон абляции), сократить стоимость лечения за счет сокращения повторных вмешательств и стандартизировать подходы к абляции при фибрилляции предсердий.

Литература

1. Wang H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // The Lancet. 2016. Vol. 388, No. 10053. P. 1459–1544.

2. Isensee F. et al. nnU-Net: a self-configuring method for deep learning-based biomedical image segmentation // Nature Methods. 2021. Vol. 18, No. 2. P. 203–211.

3. Plank G. et al. The openCARP simulation environment for cardiac electrophysiology // Computer Methods and Programs in Biomedicine. 2021. Vol. 208. P. 106223.

4. Azzolin L. et al. AugmentA: Patient-specific augmented atrial model generation tool // Computerized Medical Imaging and Graphics. 2023. Vol. 108. P. 102265.

5. Courtemanche M., Ramirez R. J., Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model // American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 1998. Vol. 275, No. 1. P. H301–H321.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-363

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ АПТАМЕРЫ К АНТАГОНИСТАМ WNT-ПУТИ DICKKOPF-1 И СКЛЕРОСТИНУ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТАРГЕТНЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТЕОПОРОЗА*

OLIGONUCLEOTIDE APTAMERS TO WNT PATHWAY ANTAGONISTS DICKKOPF-1 AND SCLEROSTIN AS PROMISING TARGET AGENTS FOR THE TREATMENT OF OSTEOPOROSIS

Н. А. Слажнева[1], Н. А. Бондаренко[1], М. А. Воробьева[2], Е. А. Шатунова[2], В. В. Коваль[1,2], В. О. Омельченко[1]

[1]НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

N. A. Slazhneva[1], N. A. Bondarenko[1], M. A. Vorobyeva[2], E. A. Shatunova[2], V. V. Koval[1,2], V. O. Omelchenko[1]

[1]Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk
[2]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ sitnikovanat9@gmail.com

Аннотация

Остеопороз — глобальная проблема здравоохранения, значение которой увеличивается с ростом и старением населения. В данном исследовании на модели *in vitro* оценен потенциал использования аптамеров к антагонистам Wnt-пути для лечения остеопороза. Установлено, что модифицированные ДНК-аптамеры к белкам Dickkopf-1 и склеростину влияют на уровни экспрессии ключевых генов, задействованных в ремоделировании костной ткани: гена коллагена 1-го типа и гена RANKL.

Abstract

Osteoporosis is a global health problem whose importance increases with the growth and aging of the population. Here, we estimated in vitro the potential of aptamers targeted to Wnt antagonists for osteoporosis treatment. It was found that modified DNA aptamers against Dickkopf-1 and sclerostin proteins influence the levels of expression of key genes involved in bone tissue remodeling, namely the type 1 collagen gene and the RANKL gene.

Введение

Остеопороз является серьезным заболеванием с потерей костной массы, снижением плотности кости и разрушением ее микроструктуры. Его развитие находится под контролем нескольких сигнальных путей, в том числе Wnt-пути, который регулирует дифференцировку и пролиферацию хондроцитов, остеобластов, мезенхимальных стволовых клеток и остеокластов [1]. Антагонисты Wnt-пути Dickkopf-1 (DKK-1) рассматривают в качестве мишеней для лечения остеопороза. Перспективным способом таргетного ингибирования функциональной активности белков является использование олигонуклеотидных аптамеров.

Цель — исследовать влияние аптамеров к DKK-1 и склеростину на уровни экспрессии ключевых для ремоделирования костной ткани генов коллагена 1-го типа и RANKL в остеобластах человека.

Материалы и методы

В работе использованы ДНК-аптамеры к склеростину aptscl56 [2] и scl2 [3], ДНК-аптамеры к DKK-1 TD10 [4] и DK4_41t [5]. Для повышения их биологической устойчивости заменяли четыре концевых дезоксирибонуклеотида 2′-О-метилрибонуклеотидами и вводили на 3′-конец 3′-3′-фосфодиэфирную связь. В случае аптамера scl2 модифицировали только 5′-фрагмент (scl2-1) либо 5′- и 3′-фрагменты (scl2-2). Аптамеры были синтезированы твердофазным фосфитамидным методом. Их аффинности оценивали колориметрически с иммобилизацией белка в лунках планшета. Остеобласты человека U2OS культивировали в течение 14 дней в остеогенной среде, затем вносили аптамеры (500 нМ) на 24 и 48 ч. Клетки лизировали реагентом «Лира» (Биолабмикс) и выделяли РНК хлороформ-изопропаноловым методом. Для количественной ОТ-ПЦР использовали набор Биолабмикс с праймерами к генам коллагена 1-го типа, RANKL и флуоресцентными зондами, на приборе LightCycler480 (Roche).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-20111) и Правительства Новосибирской области (соглашение № 81).

© Н. А. Слажнева, Н. А. Бондаренко, М. А. Воробьева, Е. А. Шатунова, В. В. Коваль, В. О. Омельченко, 2025

Результаты

Получена серия химически модифицированных ДНК-аптамеров к склеростину и DKK-1, специфично связывающих белки-мишени с константами диссоциации в диапазоне 3–41 нМ. Количественный ОТ-ПЦР-анализ показал, что аптамеры к склеростину scl2-1, scl2-2 повышают экспрессию гена коллагена 1-го типа в остеобластах через 24 ч в 2,8 и 3,8 раза соответственно, а через 48 ч уровень экспрессии снижается до контрольного (без добавления аптамеров). Для аптамера aptscl56 отмечена та же тенденция, но повышение уровня экспресии выражено менее значимо. Аптамеры к DKK-1 (TD10 и DK4_41t) не изменяют уровень экспрессии гена коллагена через 24 ч, а через 48 ч он значимо снижается.

Влияние аптамеров на уровень экспрессии цитокина RANKL оказалось разнонаправленным. Так, аптамеры scl2-1 и TD-10 повышают уровень экспрессии гена RANKL по сравнению с контролем через 24 ч. В случае scl2-2 и DK4_41t уровень экспрессии RANKL через 24 ч не изменяется, а в случае аптамера aptscl56 — значимо снижается. При этом все исследованные аптамеры через 48 ч инкубации значительно снижали уровень экспрессии RANKL. Известно, что цитокин RANKL, продуцируемый остеобластами, активирует остеокласты, а для лечения остеопороза важно снижать их активность.

Выводы

Таким образом, аптамеры к склеростину увеличивают экспрессию гена коллагена 1-го типа в остеобластах, что может свидетельствовать о подавлении активности склеростина и активации Wnt-пути, регулирующего функциональную активность клеток, в остеобластах. Влияние аптамеров на экспрессию гена RANKL является более комплексным. Можно заключить, что аптамеры являются перспективными для более детального изучения их таргетных взаимодействий с ингибиторами Wnt-пути, подбора оптимального режима дозирования и исследования активности *in vivo*.

Литература

1. Liu J., Xiao Q., Xiao J. et al. Wnt/β-catenin signaling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities // Signal Transduction Targeted Ther. 2022. Vol. 7. P. 3.

2. Yu Y., Wang L., Ni S. et al. Targeting loop3 of sclerostin preserves its cardiovascular protective action and promotes bone formation // Nature Communications 2022. Vol. 13. P. 4241.

3. Shum K. T., Chan C., Leung C. M. et al. Identification of a DNA aptamer that inhibits sclerostin's antagonistic effect on Wnt signalling // Biochemistry Journal. 2011. Vol. 434. P. 493–501.

4. Zhou Y., Li W., Tseng Y. J. et al. // Developing slow-off Dickkopf-1 aptamers for early-diagnosis of hepatocellular carcinoma. Talanta. 2019. Vol. 194. P. 422–429.

5. Shatunova E. A., Rychkova A. S., Meschaninova M. I. et al. Novel DNA aptamers to Dickkopf-1 protein and their application in colorimetric sandwich assays for target detection in patients with axial spondyloarthritis // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25. P. 12214.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-364

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА И ЕЕ МЕТАБОЛИТЫ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ НА ФОНЕ ИНВАЗИИ *OPISTHORCHIS FELINEUS* *

THE INTESTINAL MICROBIOTA AND ITS METABOLITES IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA AND *OPISTHORCHIS FELINEUS* INFECTION

Т. С. Соколова, В. В. Куленич, О. С. Федорова

Сибирский государственный медицинский университет, Томск

T. S. Sokolova, V. V. Kulenich, O. S. Fedorova

Siberian State Medical University, Tomsk

✉ sokolova.ts@ssmu.ru

Аннотация

Проведен анализ таксономического состава кишечной микробиоты у детей, больных бронхиальной астмой (БА), в зависимости от наличия инвазии *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) с использованием метода секвенирования 16S рРНК. Также выполнена оценка уровня короткоцепочечных жирных кислот в образцах стула исследуемых групп. Выявлены значимые различия в составе микробиоты кишечника и увеличение таксономического богатства у детей с БА на фоне инвазии *O. felineus*.

Abstract

The taxonomic composition of the intestinal microbiota in children with bronchial asthma was analyzed depending on the presence of *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) infection using the 16S rRNA sequencing. The level of short-chain fatty acids in the stool samples of the studied groups was also assessed. Significant differences in the composition of the intestinal microbiota and an increase in taxonomic richness were revealed in children with asthma against the background of *O. felineus infection.*

В исследованиях показано, что гельминтозы могут влиять на течение аллергических болезней, в том числе бронхиальной астмы (БА). В настоящее время существуют данные, указывающие на роль кишечной микробиоты в развитии БА [1]. Результаты исследований показывают, что гельминтная инвазия модифицирует состав кишечных бактериальных сообществ, а микробиота, в свою очередь, способствует иммуномодулирующим эффектам паразитов [2]. Предполагается, что одним из механизмов этого влияния является продукция короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) за счет участия в регуляции дифференцировки Т-регуляторных клеток [3]. Цель исследования — провести анализ таксономического состава кишечной микробиоты и ее метаболитов у детей, больных БА, в зависимости от наличия инвазии *O. felineus*.

В исследование включено 100 детей в возрасте 7–16 лет: группа 1 — дети с БА (n = 50, средний возраст 10,34 ± 2,99 года), группа 2 — дети с БА на фоне инвазии *O. felineus* (n = 50, средний возраст 13 ± 2,6 года). Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России № 8946 от 24.01.2022. Для всех участников выполнен сбор анамнеза и физикальное обследование. Сбор образцов стула проводили с использованием специального набора с транспортной средой (Stool Collection kit, Nobias Technologies). Наличие инвазии *O. felineus* определяли по данным микроскопии образцов стула с использованием концентраторов PARASEP.

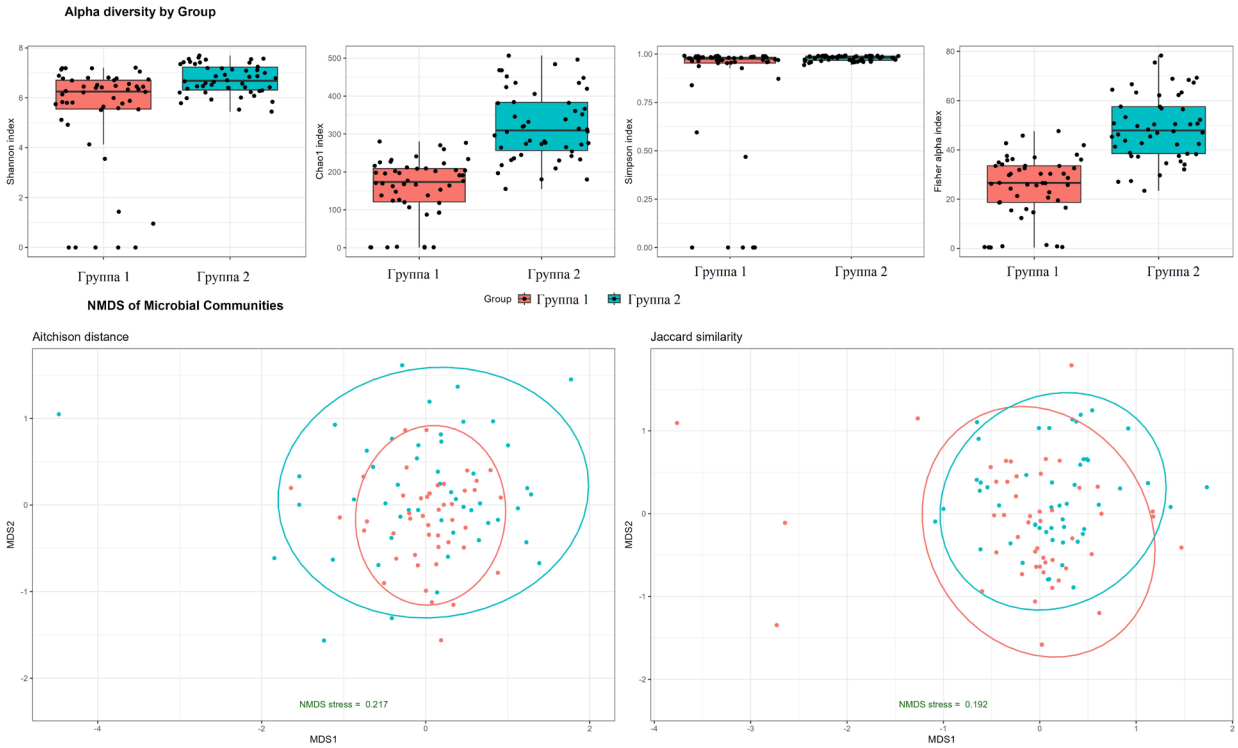
Для выделения ДНК использовался набор Nobias DNA Extraction Kit. Секвенирование региона V3–V4 гена 16S рРНК (праймеры 341F-801R, ООО НПФ «Литех», Россия) проведено на приборе Illumina MiSeq. Оценка уровня КЦЖК в образцах стула методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Ultimate 3000, Thermo Scientific, США). Анализ проводился с помощью программного обеспечения QIIME2 и R 4.3.3. Таксономическая классификация осуществлена по базе SILVA 138. Оценка альфа-разнообразия проводилась с помощью коэффициентов Шеннона, Симпсона, Фишера и Chao 1. Бета-разнообразие оценивалось с помощью непараметрического перестановочного множественного дисперсионного анализа PERMANOVA с использованием матрицы расстояний на основе метрик Эйчисона (пакеты vegan, car) и Жаккара. Сравнение количественных переменных с распределением, отличным от нормального, в двух группах проводилось с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни (пакет sjstats). Поиск зависимостей между представленностью бактерий и факторными переменными проводился с помощью обобщенных смешанных линейных моделей с отрицательным биномиальным рас-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-75-00078).

© Т. С. Соколова, В. В. Куленич, О. С. Федорова, 2025

пределением (пакет Maaslin2). Из анализа исключены редкие таксоны, которые присутствовали на уровне менее 0,2 % в отдельном образце. Уровень значимости для всех статистических тестов $p < 0,05$.

В результате анализа выявлены статистически значимые различия альфа- и бета-разнообразия между образцами пациентов групп 1 и 2 (см. рисунок).



Анализ альфа- и бета-разнообразия бактериальных сообществ в исследуемых группах

Кишечная микробиота детей с БА на фоне инвазии *O. felineus* характеризовалась более высоким содержанием бактерий родов *Bifidobacterium, Subdoligranulum, Catenibacterium*, семейства *Christensenellaceae*. В группе детей с БА без описторхоза выявлено увеличение представленности *Eubacterium, Alistipes, Bacteroides*.

Сравнительный анализ состава КЦЖК показал, что у детей с БА на фоне описторхоза в образцах стула уровень муравьиной (С1) и уксусной (С2) кислот достоверно выше в сравнении с участниками с БА без инвазии (см. таблицу). По уровню пропионовой (С3) и масляной (С4) кислот значимых различий между группами не выявлено.

Уровни КЦЖК в образцах стула исследуемых групп

КЦЖК	Группа 1	Группа 2	*p*
С1	2,60 (2,14; 3,05)	3,65 (3,06; 4,22)	< 0,001
С2	11,8 (10,7; 12,6)	13,9 (12,9; 14,4)	< 0,001
С3	0,34 (0,18; 0,56)	0,50 (0,16; 0,75)	> 0,05
С4	0,51 (0,26; 1,10)	0,61 (0,47; 0,96)	> 0,05

В результате проведенного исследования установлено, что микробиота кишечника у детей с БА на фоне описторхоза характеризуется более высоким таксономическим разнообразием, а также увеличением представленности бактерий с противовоспалительным потенциалом (*Bifidobacterium*).

Литература

1. Galeana-Cadena D., Gómez-García I.A., Lopez-Salinas K.G. et al. Winds of change a tale of: asthma and microbiome // Frontiers in Microbiology. 2023. No. 14. P. 1295215.

2. Piazzesi A., Putignani L. Impact of helminth-microbiome interactions on childhood health and development-A clinical perspective // Parasite Immunology. 2023. Vol. 45 (4). P. e12949.

3. Yip W., Hughes M.R., Li Y. et al. Butyrate shapes immune cell fate and function in allergic asthma // Frontiers in Immunology. 2021. No. 12. P. 628453.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-365

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ОЦЕНКЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ, ИМПЛАНТИРОВАННЫХ В ПРИМАТОВ *

POSSIBILITY OF USING HUMAN ANTIBODIES IN THE ASSESSMENT OF REMODELING OF VASCULAR PROSTHESES IMPLANTED IN PRIMATES

Е. А. Торгунакова, Е. А. Сенокосова, Л. В. Антонова

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово

E. A. Torgunakova, E. A. Senokosova, L. V. Antonova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo

✉ evgeniyatorgunakova@mail.ru

Аннотация

Иммунофлуоресцентный анализ позволяет расширить оценку ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов (ТСП). Разработанные мультиплексные панели иммунофлуоресцентной визуализации человеческих антител отразили основные признаки ремоделирования ТСП у приматов, по многим параметрам схожие с нативным сосудом, что подтверждает их эффективность в преклинических исследованиях.

Abstract

Immunofluorescent analysis allows for expanded assessment of tissue-engineered vascular prosthesis (TEVP) remodeling. The multiplexed human antibody immunofluorescence imaging panels we developed showed the main features of TEVP remodeling in primates, which are similar to the native vessel in many parameters, confirming their efficacy in preclinical studies.

Актуальность

Для преклинических испытаний ТСП-модель приматов является наиболее сбалансированной с точки зрения достоверной оценки долгосрочной проходимости и ремоделирования, а также высокой чувствительности к интра- и постоперационной антитромбоцитарной терапии [1]. Иммунофлуоресцентное окрашивание требует использования панелей антител к целевым маркерам. Учитывая анатомо-физиологическое сходство и эволюционное родство между обезьянами и человеком [2], мы предположили, что антитела, валидированные на человеческих тканях, обладают достаточной перекрестной реактивностью для оценки ремоделированных тканей приматов. При этом в доступной литературе наблюдается недостаток данных о применении иммунофлуоресцентного анализа в оценке ремоделирования ТСП, имплантированных в артериальное русло приматов. Заполнение этого пробела позволит получить более точные и релевантные данные о процессах интеграции и функциональности имплантатов в условиях, максимально приближенных к клиническим, что, в свою очередь, может ускорить перевод ТСП в клиническую практику.

Цель — оценить возможность применения разработанных панелей человеческих антител на эксплантированных ТСП приматов с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

Материалы и методы

Выполнена стереомикроскопия, гистологическое и иммунофлуоресцентное исследование эксплантированных ТСП у нечеловекообразных приматов рода Papio (павиан). Разработаны панели флуоресцентной визуализации в рамках преклинических испытаний сосудистых протезов. Для подтверждения применимости человеческих антител для тканей приматов мы сравнили интенсивность флуоресценции на конфокальных снимках. Сопоставляли нативную бедренную артерию приматов и внутреннюю грудную артерию человека, окрашенные теми же панелями. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.

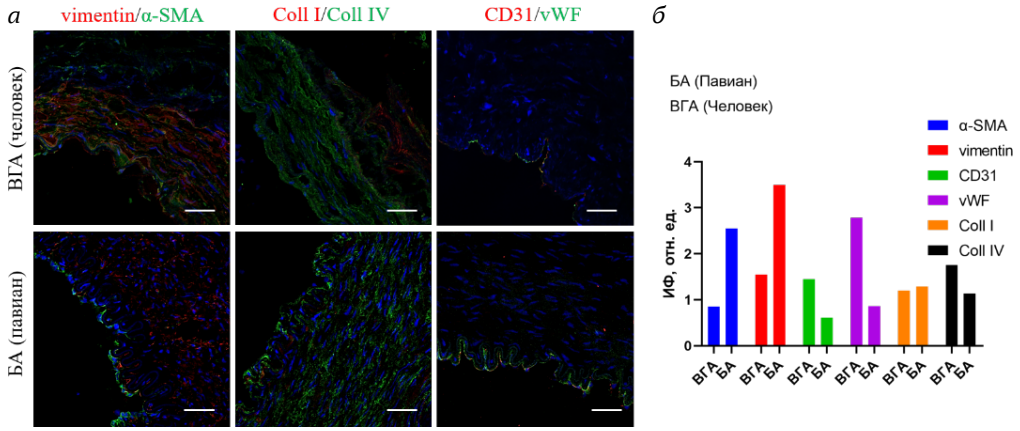
Результаты

Через 6 месяцев после имплантации ТСП продемонстрировали успешное ремоделирование в трехслойную структуру, морфологически схожую с нативной сосудистой стенкой. Сформировалась неоинтима, покрытая

* Исследование выполнено рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонифицированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».

© Е. А. Торгунакова, Е. А. Сенокосова, Л. В. Антонова, 2025

изнутри на всем протяжении эндотелиальными клетками. Средний слой был представлен сохранной стенкой протеза. Сформировалась неоадвентиция со свойственными ей форменными элементами. Во всех проходимых протезах отсутствовали признаки воспаления, кальцификации или значительной деградации каркаса. Оценка снимков, полученных с помощью конфокальной микроскопии, продемонстрировала полную эндотелизацию в 5 из 6 протезов, зрелость внеклеточного матрикса без признаков фиброза. Интенсивность флуоресценции бедренной артерии примата показала ее сопоставимость с артерией человека, что подтверждает пригодность разработанных иммунофлуоресцентных панелей (Vimentin/α-SMA, Coll IV/Coll I, CD31/vWF) для доклинической оценки (см. рисунок).



Результаты оценки интенсивности флуоресценции бедренной артерии (БА) павиана и внутренней грудной артерии (ВГА) человека: *а* — иммунофлуоресцентное окрашивание тканей БА павиана и ВГА человека, выполненное с использованием конфокальной микроскопии при увеличении 200×. Окрашивание антителами против маркеров vimentin/α-SMA, Coll I/Coll IV и CD31/vWF; *б* — сравнительный анализ интенсивности флуоресценции для различных таргетных молекул артерий павиана и человека

Выводы

Доказана высокая специфичность человеческих антител к тканям примата, направленных против ключевых клеточных маркеров, характеризующих ремоделирование, что подтверждает эффективность данных антител для мониторинга формирования новообразованной сосудистой ткани на основе ТСП.

Литература

1. Антонова Л. В., Сенокосова Е. А., Миронов А. В. и др. Особенности преклинических испытаний тканеинженерных сосудистых протезов с биодеградируемой составляющей: результативность различных животных моделей — от крыс до приматов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2025. Т. 27 (2). С. 127–138.

2. Лапин Б. А., Данилова И. Г. Перспективные направления экспериментального использования обезьян // Вестник Российской академии наук. 2020. Т. 90 (1). С. 40–46.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-366

ЧАСТОТА И СПЕКТР МУТАЦИЙ ГЕНА *PIK3CA* У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ХАНТЫ-МАНСИЙСКОМ АВТОНОМНОМ ОКРУГЕ — ЮГРЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ НА МАТЕРИАЛЕ БИОРЕСУРСНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЛАБОРАТОРИИ «БИОБАНК ЮГРЫ»*

FREQUENCY AND SPECTRUM OF *PIK3CA* GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER IN THE KHANTY-MANSIYSK AUTONOMOUS OKRUG — YUGRA: A STUDY BASED ON THE BIOBANK OF YUGRA LABORATORY'S BIORESOURCE COLLECTION

Д. Б. Туйгунова[1], А. Х. Гапурова[1], М. Л. Сафронова[1], А. К. Багиров[2]

[1] *Сургутский государственный университет*
[2] *Сургутская окружная клиническая больница*

D. B. Tuigunova [1], A. Kh. Gapurova[1], M. L. Safronova[1], A. K. Bagirov[2]

[1] *Surgut State University*
[2] *Surgut Regional Clinical Hospital*

✉ diana258168@mail.ru

Аннотация

Исследование методом таргетного секвенирования нового поколения патогенных вариантов в гене *PIK3CA* для когорты спорадических случаев рака молочной железы у пациенток из ХМАО-Югры (*N* = 49) позволило выявить их спектр и частоту. Наиболее частыми оказались варианты c.3140A>G, c.1633G>A. Подтверждена эффективность NGS-секвенирования для обнаружения редких мутаций, что имеет важное значение при выборе персонализированной терапии.

Abstract

The study of pathogenic variants in the PIK3CA gene using targeted next-generation sequencing (NGS) for a cohort of sporadic breast cancer cases in patients from the Khanty-Mansi Autonomous Area — Yugra (N = 49) revealed their spectrum and frequency. The most common variants were c.3140A>G and c.1633G>A. The effectiveness of NGS for detecting rare mutations was confirmed, which is of great importance in selecting personalized therapy approach.

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемой злокачественной опухолью среди женщин во всем мире, при этом подтип гормонозависимого метастатического РМЖ с низкой экспрессией рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HR+ HER2– РМЖ) составляет примерно 60 % всех случаев [1]. Основой лечения подобной патологии является гормонотерапия, иногда дополненная пан-ингибиторами фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) (алпелисиб, фулвестрант, бупарлисиб). Однако со временем положительный ответ на терапию уменьшается из-за приобретенных мутаций, придающих резистентность, а также вариабельности эффективности лечения, связанной со специфическими молекулярными профилями опухолей и индивидуальной генетикой пациента [2]. Одной из основных причин развития гормонорезистентности при РМЖ служит мутация гена *PIK3CA*: она является драйверной, поскольку приводит к активации сигнальных путей, при этом возникает очень рано на фоне прогрессирования заболевания, предоставляя возможность ранней диагностики и применения таргетной терапии.

Цель работы — характеристика частоты и спектра мутаций *PIK3CA* у пациенток с РМЖ, проживающих в ХМАО-Югре. На основе собранной в биобанке Югры биоресурсной коллекции «Онкопатология» был выполнен анализ образцов крови, собранных у 49 женщин, проходивших лечение в онкологическом отделении онкогинекологии и опухолей молочной железы Сургутской окружной клинической больницы. Для выявления мутаций применялась технология NGS с использованием набора реагентов «HELICON Атлас Плюс» производства «Онко-Атлас» на секвенирующей установке DNBSEQ G50RS (MGI, KHP). Интерпретация и анализ данных проводились с использованием программного обеспечения Solo AVES («ОнкоАтлас», Россия).

Результаты исследования: в 49 исследованных образцах РМЖ выявлены 10 различных мутаций в гене *PIK3CA* (см. таблицу).

Наиболее часто встречающаяся мутация c.3140A>G выявлена у 24 женщин (частота 0,4898). Данный вариант демонстрирует ассоциацию с патогенезом, что подчёркивает его потенциальную роль в развитии РМЖ. Вто-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-574-05.

© Д. Б. Туйгунова, А. Х. Гапурова, М. Л. Сафронова, А. К. Багиров, 2025

рой по частоте является мутация c.1633G>A, выявленная у 12 женщин (частота 0,2449); мутация c.1624G>A обнаружена у 4 пациенток (частота 0,0816). Варианты c.3140A>T и c.1258T>C выявлены дважды (частота 0,0408). Редко выявленные мутации c.313_321del, c.1035T>A, c.1638G>T, c.263G>A* и c.3145G>C* встречались лишь однажды (частота 0,0204). Несмотря на редкость выявления данных вариантов, их идентификация расширяет знания о возможностях вариабельности гена *PIK3CA*.

Характеристика и частота выявленных мутаций в гене *PIK3CA*

HGVS cDNA	HGVS белок	dbSNP (rs)	Тип	Клин. знач.	Кол-во	Частота мутации
c.3140A>G	p.His1047Arg	rs121913279	Миссенс	P	24	0,4898
c.1633G>A	p.Glu545Lys	rs104886003	Миссенс	LP	12	0,2449
c.1624G>A	p.Glu542Lys	rs121913273	Миссенс	P	4	0,0816
c.3140A>T	p.His1047Leu	rs121913279	Миссенс	P	2	0,0408
c.1258T>C	p.Cys420Arg	rs121913272	Миссенс	LP	2	0,0408
c.313_321del	p.V105_N107del	rs1553820381	Делеция без сдвига рамки	LP	1	0,0204
c.1035T>A	p.Asn345Lys	rs121913284	Миссенс	LP	1	0,0204
c.1638G>T	p.Gln546His	rs1057519940	Миссенс	LP	1	0,0204
c.263G>A*	p.Arg88Gln	rs121913287	Миссенс	P	1	0,0204
c.3145G>C*	p.Gly1049Arg	rs121913277	Миссенс	P	1	0,0204

Примечание: * — компаунд-гетерозигота; P — патогенный вариант; LP — вероятно патогенный.

Исследование показало значительное разнообразие мутаций гена *PIK3CA*, однако распределение частот отдельных вариантов демонстрирует выраженную неоднородность. Наиболее распространенные мутации сосредоточены в экзонах 9 (c.1633G>A, c.1624G>A) и 20 (c.3140A>G), известных как «горячие точки». Выявление данных вариаций гена *PIK3CA* имеет клиническое значение, способствуя подбору персонализированной терапии, прогнозированию ответа на лечение у пациенток с HR+ HER2− РМЖ, а также разработке стандартизированных протоколов тестирования.

Литература

1. Feng Y. et al. Predicting breast cancer prognosis using PR and PIK3CA biomarkers: a comparative analysis of diagnostic groups // BMC cancer. 2025. Vol. 25, No. 1. P. 68.

2. Павленко И. А. и др. Особенности мутаций в гене PIK3CA при раке молочной железы с низкой экспрессией Her2/neu // Вопросы онкологии. 2023. Т. 69, № 3S. С. 128–129.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-367

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ ВИНДЕБУРНОЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ *

PROSPECTS OF USING A NEW THERAPEUTIC AGENT BASED ON VINDEBURNOL FOR THE CORRECTION OF COGNITIVE IMPAIRMENT

В. М. Ушакова[1,2], Я. А. Зоркина[1,2], Е. А. Зубков[1,2], О. В. Абрамова[1,2], А. Ю. Морозова[2], О. И. Гурина[2], В. А. Макаров[1]

[1] *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Москва*

V. M. Ushakova[1,2], Ya. A. Zorkina[1,2], E. A. Zubkov[1,2], O. V. Abramova[1,2], A. Yu. Morozova[2], O. I. Gurina[2], V. A. Makarov[1]

[1] *Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow*
[2] *V. P. Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology, Moscow*

✉ ushakovavm@yandex.ru

Аннотация

Поиск средств для коррекции когнитивных нарушений является важной задачей. Основой для разработки подобных препаратов может стать соединение виндебурнол (VIND). В нашей работе было показано, что использование производного VIND приводит к изменению дифференциальной экспрессии генов в области голубого пятна и оказывает терапевтическое действие в экспериментальной модели болезни Альцгеймера.

Abstract

The search of new therapy methods for cognitive impairments treatment is an urgent task. The compound vindeburnol (VIND) may be the basis for the development of new drugs. In our research, we have shown that the VIND derivative changes differential gene expression signature in the locus coeruleus and produces a positive effect in an experimental model of Alzheimer's disease.

Когнитивные нарушения сопровождают многие психопатологии, включая депрессию, тревожные расстройства и различные деменции. При болезни Альцгеймера усугубляющееся нарушение когнитивных функций приводит к потере способности самостоятельно справляться с ежедневными задачами, необходимости постоянного ухода и увеличению финансовых затрат здравоохранения [1].

Виндебурнол (VIND) — синтетическое производное алкалоида винкамина, демонстрирует терапевтические свойства в ряде экспериментальных моделей на животных, таких как ишемия головного мозга, депрессия, болезнь Альцгеймера [2]. Предположительный механизм действия соединения связывают с активацией тирозингидроксилазы в области голубого пятна [3]. Положительные эффекты применения вещества указывают на перспективы исследования его производных в коррекции когнитивных нарушений, в том числе при нейродегенеративной патологии. В связи с этим целью работы стал поиск производного VIND, обладающего потенциалом в отношении коррекции когнитивных нарушений, анализ влияния на экспрессию генов в области голубого пятна и оценка эффективности выбранного вещества в модели болезни Альцгеймера.

На первом этапе работы был проведен скрининг 38 различных соединений в поведенческих тестах, направленных на оценку распознавания, рабочей и пространственной памяти, в результате которого было выбрано вещество-лидер ВБ-127.

РНК-секвенирование дифференциально экспрессируемых генов в образцах голубого пятна выявило изменение экспрессии ряда генов у грызунов, получавших ВБ-127, по сравнению с контрольной группой. Среди обнаруженных генов были определены гены, связанные с метаболизмом липидов (*Pla2g3, Fabp7, Pnpla2, Mfsd2a*), регуляцией энергетического обмена (*Vwa8, Atp6ap2, Selenot*), формированием цитоскелета (*Capn11*), клеточной адгезией нейронов (*Nlgn3*), передачей сигналов внутри клетки (*Map3k6, Metap2, Prkar1a*) и др. Эти данные указывают на влияние исследуемого вещества на функционирование и поддержание клеток, что особенно важно при деградации нервной ткани.

* Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования РФ № FFEN-2025-0001.
© В. М. Ушакова, Я. А. Зоркина, Е. А. Зубков, О. В. Абрамова, А. Ю. Морозова, О. И. Гурина, В. А. Макаров, 2025

Для подтверждения нейропротекторных свойств ВБ-127 эффективность соединения в дозе 20 мг/кг была исследован в модели болезни Альцгеймера на грызунах (n = 31), а также сравнена с клинически используемым препаратом мемантином (10 мг/кг). Моделирование нейродегенеративной патологии осуществлялось за счет билатерального стереотаксического введения стрептозотоцина (Abcam, США) в дозе 3 мг/кг, растворенного в 0,05%-м растворе аскорбиновой кислоты, в желудочки головного мозга самцов крыс Wistar (AP: −1; L: ± 1,5; V: −4,3). В результате оценки поведения животных было показано, что применение ВБ-127 привело к восстановлению сниженной двигательной активности животных в тесте «открытое поле» (p < 0,05). Кроме того, наряду с мемантином, использование ВБ-127 улучшило когнитивные показатели лабораторных животных в тесте «распознавание нового объекта», что выражалось в значимом увеличении индекса дискриминации (p < 0,05 для группы «мемантин», p < 0,001 для группы «ВБ-127»). Более того, в отличие от мемантина, анализируемое соединение снизило депрессивно-подобные и тревожные проявления у крыс с индуцированной болезнью Альцгеймера. Было показано статистически значимое увеличение длительности социальных контактов с ювенильными самцами (p < 0,001), а также снижение длительности замирания в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (p < 0,01).

Таким образом, выбранное производное виндебурнола продемонстрировало потенциал в коррекции когнитивных нарушений, а также подтвердило предположительные нейропротекторные свойства. Дальнейшие исследования должны быть направлены на тщательный анализ нейрохимических эффектов использования ВБ-127 для понимания механизма действия соединения и углубления доклинических испытаний.

Литература

1. Tenchov R., Sasso J. M., Zhou Q. A. Alzheimer's Disease: Exploring the Landscape of Cognitive Decline // ACS Chemical Neuroscience. 2024. Vol. 15, No. 21. P. 3800–3827.

2. Egorova A., Zubkov E., Makarov V. Vindeburnol: A Natural Product-Inspired Chemical Tool for Central Nervous System Drug Design // European Journal of Medicinal Chemistry. 2024. Vol. 280. P. 116966.

3. Braun D., Feinstein D. L. The Locus Coeruleus Neuroprotective Drug Vindeburnol Normalizes Behavior in the 5xFAD Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease // Brain Research. 2019. Vol. 1702. P. 29–37.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-368

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПАРАТГОРМОНОМ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ *

MOLECULAR MECHANISMS OF ADIPOSE-DERIVED MSCS OSTEOGENIC DIFFERENTIATION REGULATION VIA PARATHYROID HORMONE

А. П. Федоровский, В. А. Усачёв, К. Ю. Кулебякин

Медицинский научно-образовательный институт МГУ им. М. В. Ломоносова

A. P. Fedorovsky, V. A. Usachev, K. Y. Kulebyakin

Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University

✉ fedorovskyap@mail.ru

Аннотация

Некоторые наследственные заболевания, связанные с нарушением сигналинга паратгормона (ПТГ), проявляются очагами эктопической оссификации в жировой ткани. Нами показано, что ПТГ оказывает проостеогенное действие на дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток (МСК) жировой ткани. В данной работе мы показали, что секретируемый МСК жировой ткани паракринный фактор SERPINF1 определяет часть проостеогенного эффекта ПТГ на МСК жировой ткани.

Abstract

Several hereditary diseases are caused by the impairment in parathyroid hormone (PTH) signaling and manifest as focuses of ectopic ossification in adipose tissue. PTH exerts proosteogenic effect on adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation. In this work we found that paracrine factor SERPINF1, secreted by MSCs in response to PTH stimulation, defines a part of the proosteogenic PTH effect on adipose-derived MSCs.

Паратгормон является основным регулятором фосфорно-кальциевого обмена в организме. Однако, ПТГ и ПТГ-подобные пептиды оказывают значительное влияние на процессы, происходящие в других тканях, в частности в жировой [1]. Некоторые наследственные заболевания, связанные с нарушением сигнального пути ПТГ, такие как псевдогипопаратиреоз и прогрессирующая остеоидная гетероплазия, проявляются очагами эктопической оссификации в жировой ткани [2, 3]. Механизм их возникновения до сих пор полностью не известен. В данном исследовании мы сосредоточились на выяснении молекулярных механизмов ПТГ-зависимой регуляции остеогенной дифференцировки МСК жировой ткани.

Мы показали, что субпопуляции МСК по-разному отвечают на гормональную стимуляцию ПТГ. Это обусловлено внутриклеточным сопряжением рецептора ПТГ 1-го типа с разными G-белками, что приводит к активации разных сигнальных путей при стимуляции ПТГ [4]. Активация цАМФ-зависимого сигнального каскада приводила к усилению остеогенной дифференцировки МСК, а активация фосфолипаза С-зависимого сигнального каскада — к ее ослаблению. При этом внутриклеточная активация цАМФ или ФЛС сигнальных каскадов находится в динамическом равновесии. Мы установили, что важную роль в унификации дифференцировочного ответа всей популяции клеток на ПТГ играют продуцируемые паракринные факторы (секретом). По результатам проведенного протеомного анализа этого секретома были определены несколько белков, концентрация которых значительно повышается под действием ПТГ. Одним из таких белков является SERPINF1 — модулятор Wnt-сигнального пути. Мы провели деплецию SERPINF1 из секретома МСК с помощью иммунопреципитации. Полученный в результате секретом оказывал меньший проостеогенный эффект по сравнению с контрольным секретомом, что выражалось уменьшением отложений солей кальция, выявляемых окрашиванием ализариновым красным, а также снижением экспрессии генов-маркеров остеогенной дифференцировки, таких как Runx2.

Полученные результаты указывают на возможные регуляторы проостеогенного эффекта ПТГ на МСК жировой ткани. Это способствует большему пониманию механизмов дифференцировки МСК, а также может помочь в создании лекарственных препаратов, направленных на дифференцировку МСК в конкретном направлении.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-75-30005).

© А. П. Федоровский, В. А. Усачёв, К. Ю. Кулебякин, 2025

Литература

1. Rendina-Ruedy E., Rosen C. J. Parathyroid Hormone (PTH) Regulation of Metabolic Homeostasis: An Old Dog Teaches Us New Tricks // Molecular Metabolism. 2022. Vol. 60. P. 101480.

2. Bastepe M. GNAS Mutations and Heterotopic Ossification // Bone. 2018. Vol. 109. P. 80–85.

3. Воронцова М. В. и др. Паратиреоидный гормон в регуляции процессов роста и резорбции кости в норме и патологии // Вестник Российской академии медицинских наук. 2021. Т. 76, № 5. С. 506–517.

4. Kulebyakin K. et al. Dynamic Balance between PTH1R-Dependent Signal Cascades Determines Its Pro- or Anti-Osteogenic Effects on MSC // Cells. 2022. Vol. 11, No. 21. P. 3519.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-369

ПЕРИЦИТЫ ЯВЛЯЮТСЯ КЛЮЧЕВЫМИ РЕГУЛЯТОРАМИ ТОНУСА СОСУДОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *

PERICYTES ARE KEY REGULATORS OF VASCULAR TONE IN MAMMAL ADIPOSE TISSUE

В. И. Чечехин, Е. С. Чечехина, В. В. Сюткина, Ю. Г. Антропова, К. Ю. Кулебякин, В. А. Ткачук

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

V. I. Chechekhin, E. S. Chechekhina, V. V. Syutkina, Y. G. Antropova, K. Y. Kulebyakin, V. A. Tkachuk

Lomonosov Moscow State University

✉ v-chech@mail.ru

Аннотация

Артериальная гипертензия представляет собой растущую медицинскую проблему. С помощью scRNA-seq-анализа жировой ткани человека и мыши мы установили, что рецепторы основных вазоконстрикторов (AGTR1, AVPR1A, EDNRB) экспрессируются преимущественно перицитами, а не гладкомышечными клетками. Эти данные указывают на ключевую роль перицитов в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления.

Abstract

Arterial hypertension represents a growing medical problem. Using scRNA-seq analysis of human and mouse adipose tissue, we found that receptors for major vasoconstrictors (AGTR1, AVPR1A, EDNRB) are predominantly expressed by pericytes rather than smooth muscle cells. These findings indicate a key role of pericytes in the regulation of vascular tone and blood pressure.

Артериальная гипертензия является одной из растущих проблем современной медицины, ежегодно приводя ко все большему количеству смертей по всему миру [1]. Данное заболевание приводит к полиорганным повреждениям и развитию тяжелых осложнений, таких как инфаркт миокарда и геморрагический инсульт. К основным механизмам контроля артериального давления относится регуляция работы сердца, а также изменение тонуса резистивных артерий и артериол, формирующих общее периферическое сопротивление сосудов (ОПСС). При этом большинство лекарственных препаратов, направленных на лечение артериальной гипертензии, воздействует именно на уровень ОПСС. К ним относятся, например, ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина и кальциевых каналов. ОПСС регулируется посредством воздействия гормонов и нейромедиаторов, повышающих (вазоконстрикторы) или понижающих (вазодилататоры) тонус стенки сосудов. Современное консенсусное представление о регуляции тонуса сосудов утверждает, что большая часть рецепторов к вазоконстрикторам располагается на гладкомышечных клетках (ГМК). Однако в нашей лаборатории раннее было показано, что α1A-адренорецепторы, являющиеся вазоконстрикторными, не экспрессируются на ГМК сосудов жировой ткани. Мы обнаружили, что эти рецепторы располагались на PDGFRβ+-перицитах [2]. В связи с этим мы предположили, что и другие рецепторы к вазоконстрикторам экспрессируются преимущественно на перицитах, а не на ГМК или эндотелиальных клетках.

Для того чтобы одновременно проанализировать экспрессию множества рецепторов вазоконстрикторов в различных типах периваскулярных клеток, мы применили метод РНК-секвенирования одиночных клеток. В нашей работе были использованы открытые данные РНК-секвенирования одиночных клеток подкожной жировой ткани человека и мыши из других работ [3–6]. На основе этих данных мы создали атласы клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека и мыши. Далее из полученных атласов были выделены эндотелиальные клетки артерий и артериол, ГМК и перициты. В этих клетках мы проанализировали экспрессию генов рецепторов классических вазоконстрикторов — ангиотензина II типа 1 (AGTR1), вазопрессина типа 1A (AVPR1A) и эндотелина типа B (EDNRB). Мы выяснили, что мРНК всех рецепторов экспрессировались преимущественно в перицитах, а не ГМК или эндотелиальных клетках.

Далее мы использовали иммуногистохимическое окрашивание сосудов жировой ткани человека для подтверждения результатов анализа РНК-секвенирования. Мы использовали двойное окрашивание на рецепторы к вазоконстрикторам (AGTR1 или AVPR1A) вместе со специфическими маркерами клеток сосудистой стенки. Так, для эндотелиальных клеток был выбран CD31, для гладкомышечных — CALP, а для перицитов — PDGFRβ.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-75-30005).

© В. И. Чечехин, Е. С. Чечехина, В. В. Сюткина, Ю. Г. Антропова, К. Ю. Кулебякин, В. А. Ткачук, 2025

Используя данный метод, мы показали, что как AGTR1, так и AVPR1A экспрессировали PDGFRβ+-перициты, а не CALP+ ГМК или CD31+-эндотелий.

Таким образом, мы показали, что в сосудах жировой ткани человека рецепторы основных вазоконстрикторов, таких как ангиотензин II, вазопрессин и эндотелин, экспрессируются перицитами, а не гладкомышечными клетками. Эти данные указывают на ключевую роль перицитов в регуляции тонуса сосудов и артериального давления в целом.

Литература

1. Zhou B. et al. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension // Nat. Rev. Cardiol. 2021. Vol. 18, No. 11. P. 785–802.

2. Chechekhin V. et al. Alpha1A- and Beta3-Adrenoceptors Interplay in Adipose Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Mechanism of Obesity-Driven Hypertension // Cells. 2023. Vol. 12, No. 4. P. 585.

3. Hildreth A. D. et al. Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity // Nat. Immunol. 2021. Vol. 22, No. 5. P. 639–653.

4. Liu X. et al. Single-cell RNA sequencing of subcutaneous adipose tissues identifies therapeutic targets for cancer-associated lymphedema // Cell Discov. 2022. Vol. 8, No. 1. P. 58.

5. Yang J. et al. Single-cell dissection of the obesity-exercise axis in adipose-muscle tissues implies a critical role for mesenchymal stem cells // Cell Metab. 2022. Vol. 34, No. 10. P. 1578–1593.

6. Merrick D. et al. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue // Science. 2019. Vol. 364, No. 6438. P. eaav2501.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-370

МАРКЕРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ*

METASTASIS BIOMARKERS IN BREAST CANCER FOLLOWING DIFFERENT NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY REGIMENS

А. К. Шагабудинова, Е. А. Кравцова, М. К. Ибрагимова

НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН

A. K. Shagabudinova, E. A. Kravtsova, M. K. Ibragimova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center RAS

✉ arisha.shagabudinova@mail.ru

Аннотация

Антрациклины и таксаны, широко применяемые в неоадъювантной терапии РМЖ, вызывают повреждение ДНК опухолевых клеток. Однако активация систем эксцизионной репарации в этих клетках может снижать эффективность лечения, способствуя восстановлению повреждений и развитию резистентности. Это делает изучение генов эксцизионной репарации перспективным направлением для выявления прогностических маркеров гематогенного метастазирования после НХТ.

Abstract

Anthracyclines and taxanes — cornerstone agents in breast cancer neoadjuvant therapy — induce tumor DNA damage. However, hyperactivation of excision repair systems in malignant cells may compromise treatment efficacy by restoring therapy-induced lesions and promoting resistance. This highlights the prognostic potential of excision repair gene profiling for predicting hematogenous metastasis risk post-NCT.

Введение

В настоящее время одними из наиболее эффективных и активно применяемых цитостатических средств для лечения рака молочной железы (РМЖ) в неоадъювантном режиме (неоадъювантная химиотерапия, НХТ), являются антрациклин- и таксансодержащие препараты, индуцирующие повреждения ДНК как опухолевых, так и здоровых клеток.

Механизмы репарации ДНК, особенно пути эксцизионной репарации, играют двойственную роль в прогрессировании РМЖ и устойчивости к терапии. Хотя они необходимы для поддержания стабильности генома, их гиперактивация в опухолевых клетках может способствовать химиорезистентности за счет восстановления повреждений ДНК, индуцированных лечением, что снижает вероятность pCR и повышает метастатический потенциал. В связи с этим особую актуальность приобретает исследование изменения экспрессии генов эксцизионной репарации (ГЭР) для возможности формирования панели прогностических маркеров гематогенного метастазирования после НХТ.

Цель — оценка изменений уровня экспрессии генов эксцизионной репарации в опухоли молочной железы в процессе лечения при применении различных схем неоадъювантной химиотерапии.

Материалы и методы

В исследование включены 42 больных с РМЖ $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ (стадии IIA–IIIB) люминального B HER2-негативного подтипа, средний возраст 47,1 ± 0,3 года. В качестве материала использованы биопсийные опухолевые образцы и операционный материал после НХТ на каждого пациента. РНК выделяли из парных образцов при помощи набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Для анализа уровня экспрессии ГЭР проводили полнотранскриптомный микроматричный анализ на микрочипе Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 13.0.

Результаты

Для 2 групп пациенток (1-я группа — антрациклинсодержащие схемы (CAX, ACT, FAC, AC; n = 29), 2-я группа — таксансодержащие схемы (AT, таксотер в монорежиме; n = 13)) была проведена оценка изменения уровня экспрессии ГЭР в опухоли после лечения с учетом схемы НХТ и в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-20045).

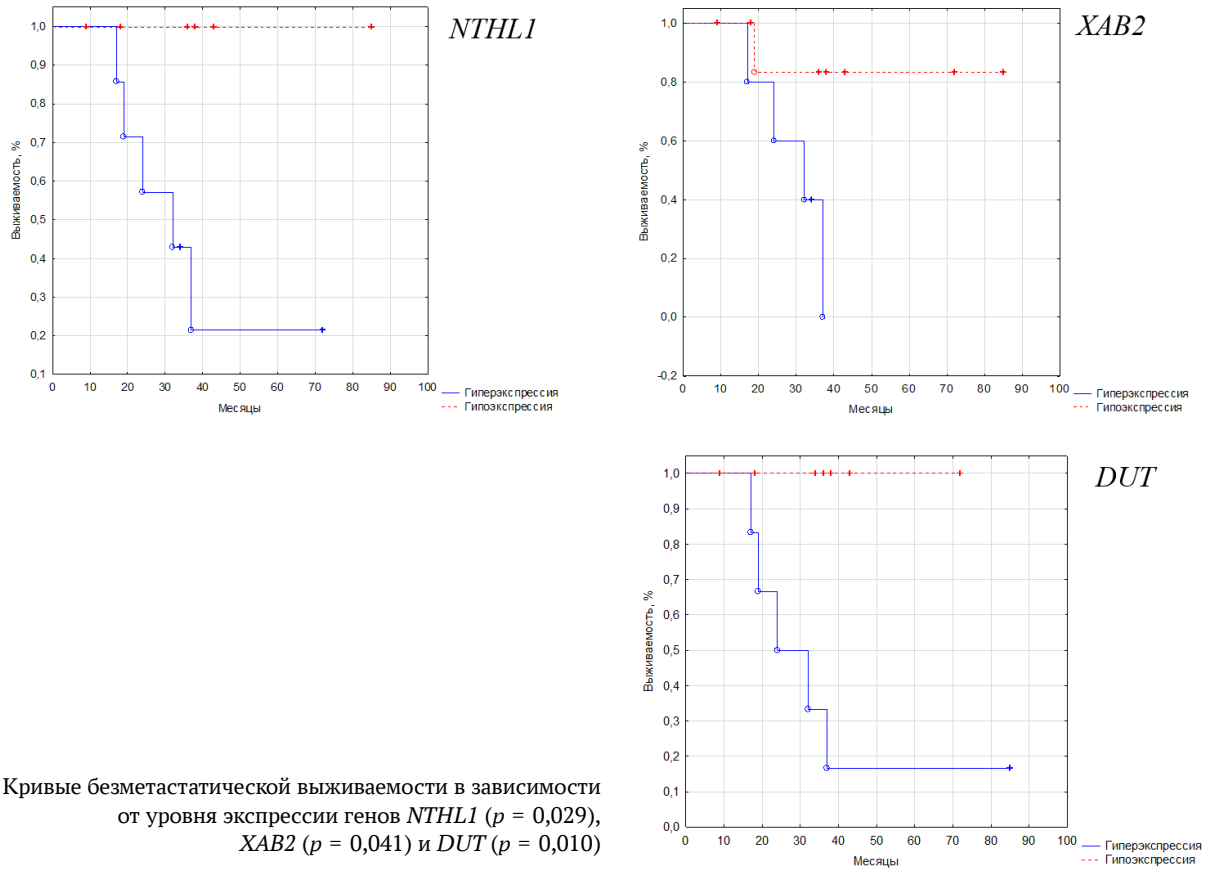
© А. К. Шагабудинова, Е. А. Кравцова, М. К. Ибрагимова, 2025

В 1-й группе пациенток наблюдалось статистически значимое снижение уровня экспрессии генов *RFC1, RAD23B, CCNH, POLB* и статистически значимое повышение уровня экспрессии в опухоли генов *DDB2, RAD52, WRN, RPA4.*

В 2-й группе пациенток наблюдалось статистически значимое снижение уровня экспрессии генов *PARP1, NTHL1, ERCC8, XAB2, DUT, CCNL2* и статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *MNAT1.*

Валидация полученных результатов (выявленных маркеров (дифференциально-экспрессируемых генов системы эксцизионной репарации)) при применении антрациклинсодержащих схем НХТ не показало статистической значимости различий при оценке безметастатической выживаемости пациентов.

Однако при применении таксансодержащих схем НХТ удалось подтвердить статистическую значимость полученных маркеров. На рисунке представлена безметастатическая выживаемость в зависимости от уровня экспрессии генов *NTHL1, XAB2* и *DUT.*



Кривые безметастатической выживаемости в зависимости от уровня экспрессии генов *NTHL1* (p = 0,029), *XAB2* (p = 0,041) и *DUT* (p = 0,010)

Показано, что при гипоэкспрессии гена *NTHL1* выживаемость без метастазов сохранялась на уровне 100 % на протяжении всего периода наблюдения. В группе гиперэкспрессии гена *NTHL1* отмечено быстрое снижение выживаемости (p = 0,029). При гиперэкспрессии гена *XAB2* также наблюдалось существенное снижение выживаемости. К 38-му месяцу кумулятивная выживаемость составила 0 %, что свидетельствует о развитии метастазов у всех пациенток в этой группе (p = 0,041). При гипоэкспрессии гена *DUT* не было зарегистрировано ни одного случая развития отдаленных метастазов. В группе с гиперэкспрессией гена *DUT* кумулятивная доля пациентов без метастазов начала снижаться уже с 17-го месяца, и к 40-му месяцу составила менее 20 %. Медиана выживаемости без отдаленных метастазов в этой группе составила приблизительно 39 месяцев, что свидетельствует о более агрессивном течении заболевания (p = 0,010).

Потенциально данные гены могут выступать в качестве прогностических маркеров возникновения гематогенного метастазирования у больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ при назначении таксансодержащих схем НХТ.

Заключение

Выявлены потенциальные прогностические экспрессионные маркеры отдаленного метастазирования при назначении таксансодержащих схем НХТ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-371

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА TRP64ARG ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА RS4994 ГЕНА ADRB3 НА ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ *

INFLUENCE OF THE TRP64ARG SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM RS4994 OF THE ADRB3 GENE ON THE LIPID PROFILE IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

Д. Д. Шашнин, М. В. Ведунова

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

D. D. Shashnin, M. V. Vedunova

N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ danila.shashnin@yandex.ru

Аннотация

В настоящей работе исследовалась зависимость между генотипами TT (64Trp/64Trp) и TC (64Trp/64Arg) однонуклеотидного полиморфизма (SNP) rs4994 гена ADRB3 и липидным обменом у лиц с метаболическим синдромом. В результате работы была установлена связь между наличием генотипа TC и повышенным содержанием в крови триглицеридов (ТГ), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и глюкозы в сравнении с генотипом TT.

Abstract

The present study investigated the association between the TT (64Trp/64Trp) and TC (64Trp/64Arg) genotypes of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs4994 in the ADRB3 gene and lipid metabolism in individuals with metabolic syndrome (MS). The results revealed a significant association between the TC genotype and elevated levels of triglycerides (TG), low-density lipoproteins (LDL), and glucose in blood compared to the TT genotype.

Введение

Метаболический синдром (МС) представляет собой совокупность нарушений обмена веществ, включая резистентность к инсулину, атерогенную дислипидемию, абдоминальное ожирение и артериальную гипертензию [1]. Несмотря на множество факторов, которые вносят вклад в развитие МС, главным является генетическая предрасположенность. В частности, много внимания уделяется исследованию SNP. Большинство SNP, ассоциированных с МС, были вовлечены в липидной обмен [2].

β3-адренорецептор (ADRB3) принадлежит семейству трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком [3], и находится преимущественно в белой и бурой жировой ткани, участвует в стимулированном катехоламинами термогенезе в жировой ткани, а также является регулятором липолиза и гликолиза в этих тканях [4, 5].

Ген ADRB3 расположен на 8-й хромосоме в позиции 8p11.1-p12 и кодирует полипептид размером 408 аминокислот. Мутация тимина (T) в цитозин (C) в 64-м кодоне гена превращает аминокислоту триптофан (Trp) в остаток аргинина (Arg). Эта мутация влияет на сродство рецепторов к норадреналину и является причиной десятикратного снижения чувствительности рецепторов адипоцитов [6].

Целью данной работы стала оценка влияния носительства аллеля C однонуклеотидного полиморфизма rs4994 гена ADRB3 на показатели липидного профиля у лиц с метаболическим синдромом.

Материалы и методы

Материалом для исследования стала цельная периферическая венозная кровь. Группу лиц с МС определяли по критерию: индекс массы тела > 25. В исследуемую группу вошли 46 человек от 20 до 70 лет (средний возраст составляет 49,31 ± 12,57 года).

Геномная ДНК была получена из клеток цельной крови, с помощью набора реагентов «ДНК-Экстран-1» («Синтол», Россия). Биохимические маркеры определялись на автоматическом анализаторе DIRUI CS-T240 (Dirui Industrial Co., Ltd, КНР) с использованием наборов реагентов DiaSys (Diagnostic Systems GmbH, Германия). SNP определялись методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в амплификаторе The Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

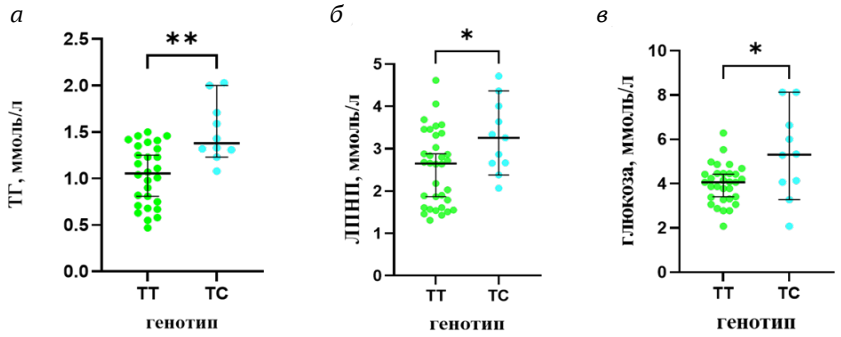
* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № FSWR-2023-0032 с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Молекулярной биологии и нейрофизиологии» Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского.

© Д. Д. Шашнин, М. В. Ведунова, 2025

Для статистической обработки применяли непараметрический U-критерий Манна — Уитни, апостериорный анализ проводили с помощью теста Данна. Данные признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Были исследованы следующие биохимические показатели у лиц с метаболическим синдромом: ТГ, ЛПНП, липопротеины высокой плотности (ЛПВП), холестерин, альбумин и глюкоза. Статистический значимый результат был получен для ТГ, ЛПНП и глюкозы (см. рисунок).



Зависимость между полиморфизмом rs4994 гена ADRB3 и биохимическими показателями: *а* — триглицеридов, *б* — липопротеинов низкой плотности, *в* — глюкозы; * — статистически значимые различия обнаружены при $p < 0,05$; ** — статистически значимые различия обнаружены при $p < 0,01$

При сравнении генотипов ТТ и ТС полиморфизма гена ADRB3 с показателями липидного профиля испытуемых была установлена ассоциация гетерозиготного варианта ТС с более высокой концентрацией триглицеридов ($p = 0,0016$), липопротеинов низкой плотности ($p = 0,0315$) и глюкозы ($p = 0,0446$) по сравнению с аллелями дикого типа (ТТ) в группе лиц с метаболическим синдромом.

Можно прийти к выводу, что гетерозиготное носительство аллеля С полиморфизма rs4994 гена ADRB3 приводит к частичному нарушению липидного профиля у лиц с МС.

Литература

1. Fahed G., Aoun L., Bou Zerdan M. et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021 // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, No. 2. P. 786.

2. Povel C. M., Boer J. M., Imholz S. et al. Genetic Variants in Lipid Metabolism Are Independently Associated with Multiple Features of the Metabolic Syndrome // Lipids in Health and Disease. 2011. Vol. 10. P. 1–7.

3. Haji E., Al Mahri S., Aloraij Y. et al. Functional Characterization of the Obesity Linked Variant of the β3 Adrenergic Receptor // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, No. 11. P. 5721.

4. Potocka N., Skrzypa M., Zadarko Domaradzka M. et al. Effects of the Trp64Arg Polymorphism in the ADRB3 Gene on Body Composition, Cardiorespiratory Fitness, and Physical Activity in Healthy Adults // Genes. 2023. Vol. 14, No. 8. P. 1541.

5. Cero C., Lea H. J., Zhu K. Y. et al. β3 Adrenergic Receptors Regulate Human Brown/Beige Adipocyte Lipolysis and Thermogenesis // JCI Insight. 2021. Vol. 6, No. 11. P. 1–18.

6. Li Y., Lu X. Z., Wang H. et al. ADRB3 Gene Trp64Arg Polymorphism and Essential Hypertension: A Meta Analysis Including 9,555 Subjects // Frontiers in Genetics. 2018. Vol. 9. P. 106.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-372

НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАСТРАТ-РЕЗИСТЕНТНОГО РАКА ПРОСТАТЫ *

NEW MOLECULAR TARGETS OF CANCER STEM CELLS IN CASTRATION-RESISTANT PROSTATE CANCER

Р. И. Шаяхметов, Т. Ч. Ле, Д. В. Ишметова, А. И. Рахматуллина, В. Н. Павлов

Институт урологии и клинической онкологии Башкирского государственного медицинского университета, Уфа

R. I. Shayakhmetov, T. Ch. Le, D. V. Ishmetova, A. I. Rakhmatullina, V. N. Pavlov

Institute of Urology and Clinical Oncology, Bashkir State Medical University, Ufa

✉ sheikhakhmetov@yandex.ru

Аннотация

В последние годы актуальной темой для исследований является изучение опухолевых стволовых клеток и их роли в развитии резистентности к противоопухолевой терапии, прогрессировании и рецидивирования злокачественных новообразований. Многие экспериментальные исследования доказывают, что опухолевые стволовые клетки могут быть ответственны за инициацию и прогрессирование рака простаты.

Abstract

In recent years, the study of cancer stem cells and their role in the development of resistance to antitumor therapy, the progression and recurrence of malignant neoplasms has become an important topic of research. Many experimental studies have shown that cancer stem cells may be responsible for the initiation and progression of prostate cancer.

Рак простаты — злокачественное многофакторное опухолевое заболевание, развивающееся из эпителия желез предстательной железы. За 2020 г. по всему миру было выявлено более 1,4 млн новых случаев рака простаты, при этом смертность составила 375 тыс. Рак простаты остается одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний и занимает второе место после опухолей легкого (17,4 %) у мужчин во всем мире [1].

Длительное лечение с помощью антиандрогеновой терапии приводит к клональной селекции, гетерогенности, стволовости опухолевых клеток и в итоге к трансформации в резистентный к антиандрогеновой терапии рак простаты. Изучение роли опухолевых стволовых клеток в прогрессировании злокачественных новообразований является важной задачей для разработки новых и эффективных методов противоопухолевой терапии при кастрат-резистентном раке простаты.

По последним данным, молекулярные мишени, такие как MDA9, HN1L, SFRP1, RCC2, PLK1 (см. таблицу), могут быть ответственны за плюрипотентность, самообновление и дифференцировку опухолевых стволовых клеток при кастрат-резистентном раке предстательной железы.

Белки, связанные со стволовостью клеток при кастрат-резистентном раке предстательной железы

Белок	Описание	Результаты	Автор
MDA9	MDA-9 является важнейшим регулятором фенотипа стволовых клеток при раке предстательной железы, который отвечает за поддержание и выживаемость ПКСК посредством регуляции множества молекул, регулирующих стволовые клетки, таких как NOTCH1, C-myc, STAT3, NANOG, OCT4 и SOX2	MDA-9 является важнейшим регулятором выживаемости и стволовых свойств опухолевых стволовых клеток за счет использования взаимосвязанных путей STAT3 и c-myc	Sarmistha Talukdar et al., 2019 [2]
HN1L	HN1L участвует в процессе роста клеток и формировании рака, а при подавлении экспрессии HN1L происходит остановка клеточного цикла. Кроме того, HN1L может способствовать переходу из фазы G1 в фазу S, тем самым способствуя пролиферации клеток	HN1L способствует развитию свойств стволовых клеток и прогрессированию рака, воздействуя на FOXP2 через сигнальный путь TGF-β в PCA	Shaojun Nong et al., 2022 [3]

* Исследование выполнено при поддержке Программы стратегического академического лидерства БГМУ «Приоритет-2030».

© Р. И. Шаяхметов, Т. Ч. Ле., Д. В. Ишметова, А. И. Рахматуллина, В. Н. Павлов, 2025

Белок	Описание	Результаты	Автор
SFRP1	SFRP1 — один из внеклеточных белков, которые модулируют сигнальный путь WNT — один из важнейших молекулярных сигнальных путей, который регулирует эмбриональное развитие и дифференцировку клеток	SFRP1 участвует в паракринной передаче сигналов эпителиальными клетками, влияя на них и положительно регулируя фенотип стволовых клеток посредством дерегуляции пути WNT/β-катенин	Alberto Losada-García et al., 2023 [4]
RCC2	Белки RCC2 и RalA необходимы для правильного функционирования кинетохор и микротрубочек на ранних стадиях митоза	RCC2 способствует развитию рака предстательной железы через сигнальный путь Hh/Gli1, регулируя эпителиально-мезенхимальный переход и состояние покоящихся клеток	Shenghan Wang et al., 2023 [5]
PLK1	Белок PLK1 обеспечивает правильное прохождение различных стадий деления клеток, включая профазу, метафазу, анафазу и телофазу. PLK1 управляет сложным процессом формирования веретена деления, сегрегации хромосом и цитокинеза	Киназа PLK1 способствует развитию Hedgehog-зависимой резистентности к антиандрогену энзалутамиду при метастатическом раке предстательной железы	Qiongsi Zhang et al., 2025 [6]

Описанные белки могут выступать в качестве прогностических биомаркеров, а также стать мишенью для разработки новых стратегий лечения прогрессирующего рака простаты.

Литература

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA Cancer J. Clin. 2021. Vol. 71, No. 3. P. 209–249.

2. Talukdar S., Das S. K., Pradhan A. K. et al. MDA-9/Syntenin (SDCBP) Is a Critical Regulator of Chemoresistance, Survival and Stemness in Prostate Cancer Stem Cells // Cancers (Basel). 2019. Vol. 12, No. 1. P. 53.

3. Nong S., Wang Z., Wei Z. et al. HN1L Promotes Stem Cell-Like Properties by Regulating TGF-β Signaling Pathway Through Targeting FOXP2 in Prostate Cancer // Cell Biology International. 2022. Vol. 46, No. 1. P. 83–95.

4. Losada-García A., Salido-Guadarrama I., Cortes-Ramirez S. A. et al. SFRP1 Induces a Stem Cell Phenotype in Prostate Cancer Cells // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2023. Vol. 11. P. 1096923.

5. Wang S., Lei Z., Liu W. et al. RCC2 Promotes Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration Through Hh/GLI1 Signaling Pathway and Cancer Stem-Like Cells // Biology Direct. 2023. Vol. 18, No. 1. P. 80.

6. Zhang Q., Peng J., Zhang Y. et al. The Kinase PLK1 Promotes Hedgehog Signaling-Dependent Resistance to the Antiandrogen Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer // Science Signaling. 2025. Vol. 18, No. 878. Art. eadi5174.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-373

ЛИПОПРОТЕИН (А) КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ ЯКУТИИ

LIPOPROTEIN (A) AS A RISK FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASES IN THE INDIGENOUS POPULATION OF YAKUTIA

С. С. Эверстова[1,2], А. В. Павлова[1], С. С. Местникова[1], А. С. Асекритова[1,2], Е. С. Кылбанова[2], О. В. Татаринова[1,3]

[1] *Республиканская клиническая больница № 3, Якутск*
[2] *Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова, Якутск*
[3] *Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск*

S. S. Everstova[1,2], A. V. Pavlova[1], S. S. Mestnikova[1], A. S. Asekritova[1,2], E. S. Kylbanova[2], O. V. Tatarinova[1,3]

[1] *Republican Clinical Hospital No. 3, Yakutsk*
[2] *M. K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk*
[3] *Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems, Yakutsk*

✉ selenaverstova@mail.ru

Аннотация

Методом сплошной выборки включены пациенты, обратившиеся к терапевту в течение 2 дней в кабинет профилактического осмотра ГБУ РС (Я) МЦ «Горная ЦРБ». При анализе уровня Лп(а) выявлено, что средний уровень данного маркера составил 10,40 ± 7,2 мг/дл у мужчин и 18,4 ± 16,29 мг/дл у женщин. Выявлена тенденция положительной корреляции между уровнями Лп(а) и ХС ЛПНП, а также увеличения частоты гипертонической болезни с возрастанием уровня Лп(а).

Abstract

Using a continuous sampling method, patients who visited a therapist over a two-day period at the preventive examination office of the State Budgetary Institution of the Republic of Sakha (Yakutia) Medical Center "Gornaya Central Regional Hospital" were included. Analysis of Lp(a) levels revealed that the average level of this marker was 10.40 ± 7.2 mg/dl in men and 18.4 ± 16.29 mg/dl in women. A positive correlation trend was identified between Lp(a) levels and LDL-C levels, as well as an increased incidence of hypertension with rising Lp(a) levels.

Введение

В современной кардиологии возрастает внимание к исследованию роли липопротеина (а) (Лп(а)) в патогенезе атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. В ряде исследований установлено, что повышенная концентрация Лп(а) в сыворотке крови напрямую связана с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, независимо от уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) [1, 3].

Недостаточная изученность данного лабораторного показателя в условиях Севера у коренного населения определяет необходимость проведения комплексного исследования с целью сравнительного анализа уровня Лп(а).

Материалы и методы

Методом сплошной выборки включены все пациенты, обратившиеся к терапевту в течение двух дней в кабинет профилактического осмотра ГБУ РС (Я) МЦ «Горная центральная районная больница (ЦРБ)». Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие и заполнили генеалогическую анкету.

Результаты

В исследование включены 88 пациентов (средний возраст: 53,85 ± 10,88 года) со статистически значимым гендерным различием: женщины составили — 83,0 % (n = 73) выборки, мужчины — 17,0 % (n = 15), что соответствует соотношению 5 : 1.

При анализе показателей Лп(а) выявлено, что средний уровень данного маркера составил 10,40 ± 7,2 мг/дл у мужчин и 18,4 ± 16,29 мг/дл у женщин.

Проведена стратификация выборки по степени сердечно-сосудистого риска на основании концентрации Лп(а) в соответствии с современными клиническими рекомендациями [1, 4]. К категории низкого риска

© С. С. Эверстова, А. В. Павлова, С. С. Местникова, А. С. Асекритова, Е. С. Кылбанова, О. В. Татаринова, 2025

(Лп(а) < 30 мг/дл) отнесено 86,4 % выборки (n = 76); средний возраст: 53,72 ± 10,35 года. Группа среднего риска (Лп(а) 30–50 мг/дл) составила 7,96 % (n = 7), со средним возрастом 51 ± 17,67 года. Уровень Лп(а) > > 50 мг/дл (высокий сердечно-сосудистый риск) был выявлен у 5,68 % (n = 5) пациентов, чей средний возраст составил 59,80 ± 6,38 года.

Максимальная зарегистрированная концентрация Лп(а) (75,9 мг/дл) отмечена у пациентки 54 лет с избыточной массой тела (ИМТ 27,9 кг/м^2) и сочетанной патологией (атеросклерозом периферических артерий и гипертонической болезнью).

Большинство обследованных женщин (83,6 %) и все мужчины (n = 15) отнесены к категории низкого риска (Лп(а) < 30 мг/дл).

Средние значения ХС ЛПНП составили 3,12 ± 0,75 ммоль/л у мужчин и 3,47 ± 0,82 ммоль/л у женщин. Исследование ограничено отсутствием информации о проводимой гиполипидемической терапии, что может внести погрешность в интерпретацию полученных результатов.

Согласно полученным данным, в группе высокого риска (Лп(а) > 50 мг/дл) средний уровень ХС ЛПНП составил 4,29 ± 0,89 ммоль/л, что превышает показатели в группах: низкого риска (3,31 ± 0,79 ммоль/л) и среднего риска (3,89 ммоль/л).

Результаты исследования демонстрируют прямую связь между уровнем Лп(а) и частотой гипертонической болезни: при повышении уровня Лп(а) отмечается увеличение частоты встречаемости гипертонической болезни. Значимая связь Лп(а) с ишемической болезнью сердца не определена, что может быть связано с низкой диагностированием данного заболевания на ранних стадиях у пациентов при первичном приеме у врача. Согласно полученным в процессе осмотра данным, у мужчины 42 лет (группа низкого риска по Лп(а) — 2,79 ммоль/л) в анамнезе зафиксирован ранний ОНМК, что подчеркивает необходимость комплексной оценки всех факторов риска.

Заключение

В обследованной группе коренного населения Севера выявлено, что у женщин (83 %) средние показатели Лп(а) выше по сравнению с мужчинами (18,4 ± 16,29 vs 10,40 ± 7,2 мг/дл). Выявлена тенденция положительной корреляции между уровнями Лп(а) и ХС ЛПНП, а также увеличения частоты гипертонической болезни с возрастанием уровня Лп(а). Отсутствие связи Лп(а) с ИБС требует проведения предтестовой вероятности ИБС для подтверждения или исключения ИБС при первичном обращении пациентов. Выявленные результаты создают необходимость для дальнейшего исследования уровня Лп(а) на более крупной выборке.

Литература

1. Ежов М. В., Кухарчук В. В., Сергиенко И. В. и др. Нарушения липидного обмена. Клинические рекомендации 2023 // Российский кардиологический журнал. 2023. Т. 28 (5). С. 250–297.

2. Полякова Е. А., Халимов Ю. Ш., Баженова Е. А., Бахер Т. М. Липопротеин (а), атеросклероз и сердечно-сосудистый риск // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2024. Т. 20 (5). С. 559–565.

3. O'Donoghue M. L., Fazio S., Giugliano R. P. et al. Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk // Circulation. 2019. Vol. 139, No. 12. P. 1483–1492.

4. Рекомендации ESC/EAS по лечению дислипидемий: модификация липидов для снижения сердечно-сосудистого риска // Российский кардиологический журнал. 2020. Т. 20 (5). С. 121–193.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-374

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ МИКРОБИОМ КИШЕЧНИКА КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА ЛЕГКИХ

GUT BACTERIAL MICROBIOME AS A RISK FACTOR FOR LUNG CANCER

А. В. Ягина, Ю. О. Баженова

Кемеровский государственный университет

A. V. Yagina, J. O. Bazhenova

Kemerovo State University

✉ yaginaarina@yandex.ru

Аннотация

В данном исследовании анализируется связь между бактериальным микробиомом кишечника и раком легких. С помощью секвенирования региона V3–V4 гена 16S рРНК был сопоставлен состав микробиоты кишечника 24 пациентов с раком легких и 11 пациентов с доброкачественными опухолями легких. Доминантными филумами бактерий у больных раком легких были *Bacteroidetes* (49,78 ± 5,1 %), *Firmicutes* (45,29 ± 4,85 %) и *Proteobacteria* (4,15 ± 1,07 %).

Abstract

This study analyzes the relationship between the gut bacterial microbiome and lung cancer. Using next generation sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene, the composition of the gut microbiota was compared in 24 patients with lung cancer and 11 patients with benign lung tumors. The dominant bacterial phyla in lung cancer patients were *Bacteroidetes* (49.78 ± 5.1 %), *Firmicutes* (45.29 ± 4.85 %), and *Proteobacteria* (4.15 ± 1.07 %).

Введение и актуальность

В результате многолетних исследований было обнаружено, что микробиота кишечника оказывает влияние на метаболическую, эндокринную и иммунную системы [1, 2]. Таксономический состав бактериального микробиома кишечника здорового человека находится в стабильном динамическом равновесии, но он может изменяться до дисбиотических состояний [3], при которых уменьшается количество полезных микроорганизмов и может увеличиться количество патогенных микроорганизмов. Также было обнаружено, что микробиота кишечника регулирует иммунный ответ легких при аллергических заболеваниях дыхательных путей и легочной вирусной инфекции. Микробиота кишечника может влиять на развитие опухоли легких за счет регуляции системного иммунного ответа [4]. Кроме того, исследование на мышах также устанавливает связь между перекрестными помехами микробиоты кишечника и развитием рака легких. Это указывает на существование дополнительных и неизученных причин развития рака легких, помимо курения, в том числе пассивного, генетической предрасположенности, экологических факторов, таких как загрязненный воздух, радоновое облучение, и прочих известных причин. Рак легких является одним из самых смертоносных злокачественных новообразований, заболеваемость и смертность от которого растут во всем мире. Рак легких состоит из мелкоклеточного рака легких и немелкоклеточного рака легких. Немелкоклеточный рак легких составляет более 80 % случаев рака легких и подразделяется на аденокарциному легких, плоскоклеточную карциному и крупноклеточную карциному [5].

Актуальность данной работы заключается в том, что спектр микробиоты кишечника при раке легких остается в значительной степени неизвестным.

Материалы и методы

Участниками исследования были пациенты в возрасте от 37 до 78 лет. В общей сложности было собрано 35 образцов фекалий, из них 24 образца у больных раком легких и 11 образцов у пациентов с доброкачественными опухолями легких, выступающих в качестве контрольной группы. При формировании выборок было установлено, что в группе с раком легких включает 8 женщин и 16 мужчин, средний возраст пациентов 63 года и обнаружено, что в этой группе 15 курящих и 9 некурящих пациентов. В группе с доброкачественными опухолями легких 4 женщины и 4 мужчины, средний возраст 55 лет, из них 3 курящих и 5 некурящих пациентов. Анализ полученных данных проводился с помощью программного комплекса QIIME2. Для выявления различий в со-

© А. В. Ягина, Ю. О. Баженова, 2025

держании отдельных таксономических единиц в микробиоте пациентов и контрольных субъектов использовали U-критерий Манна — Уитни.

Результаты

В результате секвенирования области V3–V4 гена 16S рРНК в кишечнике было идентифицировано в общей сложности 6 типов бактерий с относительной частотой выше 0,1 % (см. таблицу). Преобладающими типами бактерий в микробиомах больных раком легких и в контроле были *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, которые вместе составляли около 99 % общей микробиоты. Минорные фракции микробиома были представлены филумами *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia* в группе больных раком легких, а также *Verrucomicrobia* и *Synergistetes* у пациентов с доброкачественными опухолями легких. Не было выявлено достоверных различий содержания типов кишечных бактерий в микробиоме больных раком легких и пациентов с доброкачественными опухолями легких (см. таблицу).

Сравнение бактериального состава кишечника: рак легких vs доброкачественные опухоли

Тип бактерий	Рак легких, M ± SE	Доброкачественные, M ± SE	*P*
Firmicutes	45,29 ± 4,85	58,66 ± 4,26	> 0,05
Bacteroidetes	49,78 ± 5,1	38,86 ± 4,77	> 0,05
Proteobacteria	4,15 ± 1,07	3,45 ± 1,73	> 0,05
Actinobacteria	0,15 ± 1,12	0	> 0,05
Verrucomicrobia	0,21 ± 0,21	0,21 ± 0,21	> 0,05
Synergistetes	0	0,16 ± 0,16	> 0,05

Выводы

Настоящее исследование демонстрирует, что состав кишечной микробиоты у пациентов с раком легких и пациентов с доброкачественными опухолями легких не имеет статистически значимых различий. Преобладающими бактериальными филумами в обеих группах оставались *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, которые составляют основную массу микробиоты и не коррелируют с онкологическим процессом. Это указывает на необходимость дальнейших исследований для более глубокого понимания роли кишечной микробиоты в патогенезе рака легких и для выявления других возможных микробных маркеров, ассоциированных с заболеванием.

Литература

1. Federici M. Gut microbiome and microbial metabolites: a new system affecting metabolic disorders // Journal of Endocrinological Investigation. 2019. Vol. 42. P. 1011–1018.

2. Qi X. The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system // Gut Microbes. 2021. P. 1–21.

3. Frioux C. Enterosignatures define common bacterial guilds in the human gut microbiome // Cell Host & Microbe. 2023. P. 1111–1125.

4. Dong Q. Host-Microbiome Interaction in Lung Cancer // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. P. 1–9.

5. Zheng Y. Specific gut microbiome signature predicts the early-stage lung cancer // Gut Microbes. 2020. P. 1030–1042.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-375

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПРИЕМА АТОРВАСТАТИНА НА ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА МЫШЕЙ

EFFECT OF CHRONIC ATORVASTATIN ADMINISTRATION ON PARAMETERS OF ELECTRICAL ACTIVITY OF THE MOUSE HEART

Е. И. Яголович[1], И. Х. Джуманиязова[1,2]

[1]*Специализированный учебно-научный центр МГУ им. М. В. Ломоносова*
[2]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

E. I. Yagolovich[1], I. K. Dzhumaniyazova[1,2]

[1]*Advanced Educational Scientific Center of Lomonosov Moscow State University*
[2]*Lomonosov Moscow State University*

✉ kateyagolovich@yandex.ru

Аннотация

В работе исследовано влияние хронического перорального приема аторвастатина (10 мг/кг) на параметры потенциала действия и фоновый калиевый ток IK1 желудочковых кардиомиоцитов мышей. Выявлено, что хронический прием аторвастатина не оказывает значительного влияния на параметры электрической активности сердца мышей. Полученные данные помогают оценить действие аторвастатина на кардиомиоциты человека.

Abstract

The study investigated the effect of chronic oral administration of atorvastatin (10 mg/kg) on the parameters of the action potential and the background potassium current IK1 of ventricular cardiomyocytes in mice. It was found that chronic administration of atorvastatin does not significantly affect the parameters of the electrical activity of the heart of mice. The data obtained help to evaluate the effect of atorvastatin on human cardiomyocytes.

Аторвастатин является гиполипидемическим средством из группы статинов. Это селективный конкурентный ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы — фермента, превращающего 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент А в мевалоновую кислоту, которая является предшественником стеролов, включая холестерин. Аторвастатин снижает уровень холестерина и липопротеидов в плазме крови за счет ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы, синтеза холестерина в печени и увеличения количества «печеночных» рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) на поверхности клеток, что приводит к усилению захвата и катаболизма ЛПНП [1].

Статины часто назначают пациентам с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний, при этом около двух третей побочных эффектов статинов связаны с нервно-мышечной системой. Побочные эффекты включают судороги, миалгию, слабость, миопатию и рабдомиолиз. SAMS (Statin-Associated Muscle Symptoms) трудно диагностировать и лечить, поскольку нет подтвержденных биомаркеров/тестов, которые можно было бы использовать для подтверждения их наличия, и существует вероятность аналогичных последствий при других заболеваниях [2]. В то же время влияние аторвастатина на параметры электрической активности сердца ранее не изучалось.

Работа проводилась на белых мышах *Mus musculus* линии BALB/C, которые получали воду с аторвастатином в дозировке 10 мг/кг массы тела в течение 1 месяца. Контрольные животные получали воду с раствором ДМСО в сопоставимой концентрации (рис. 1). Далее кардиомиоциты выделяли путем гуманной эвтаназии методом цервикальной дислокации и дальнейшей ферментативной обработкой сердца коллагеназой II и трипсином. Клетки использовали для регистрации потенциалов действия (ПД) или калиевого тока I_{K1} (поддерживает потенциал покоя) через мембрану с использованием метода patch-clamp в конфигурации whole-cell в режимах фиксации тока или потенциала соответственно. Для регистрации был использован внешний раствор состава (в мМ): 150 NaCl; 3 KCl; 1,2 $MgCl_2$; 5 HEPES; pH 7,4 доведенный NaOH при комнатной температуре (24 °C) и пипеточный раствор состава (в ммоль/л): 140 KCl, 1 $MgCl_2$, 5 ЭДТА, 4 MgATP, 0,3 Na_2GTP, 10 HEPES pH 7,2, доведенный KOH при комнатной температуре (24 °C). Запись проводили с использованием программного обеспечения WinWCP, обработку данных проводили с помощью программы ClampFit, а статистический анализ — с помощью программы GraphPad Prism (использованные статистические тесты указаны в подписях к рисункам, уровень значимости приняли за 0,05). Были изучены следующие параметры электрической активности желудочковых кардиомио-

© Е. И. Яголович, И. Х. Джуманиязова, 2025

цитов: амплитуда, длительность на уровне 50 и 80 % реполяризации, потенциал покоя, максимальная скорость деполяризации и зависимость фонового калиевого тока I_{K1} от мембранного потенциала клетки.



Рис. 1. Ход эксперимента

В ходе работы было установлено, что различия между результатами контрольной и экспериментальной групп статистически незначимы (рис. 2, 3).

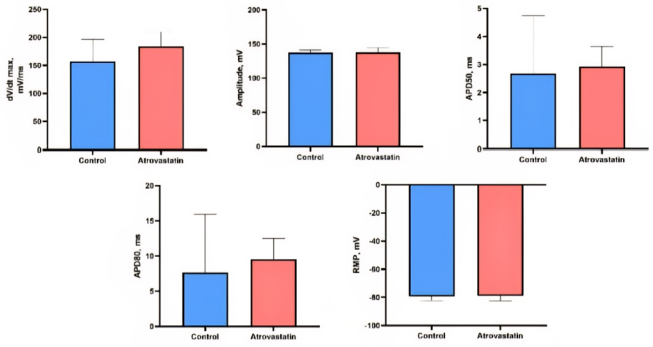


Рис. 2. Результаты измерения параметров потенциала действия в контрольных и опытных группах. Тест Манна — Уитни и *t*-тест Стьюдента. Различия незначимы

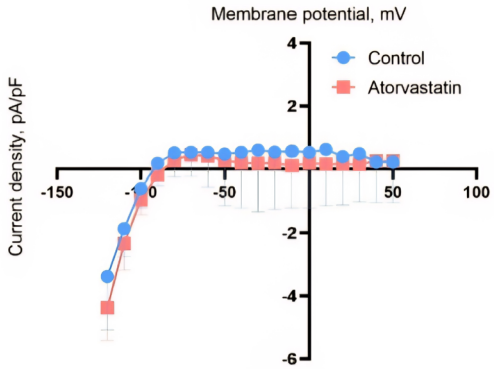


Рис. 3. Зависимость плотности фонового калиевого тока I_{K1} от мембранного потенциала. Двухфазный дисперсионный анализ. Различия незначимы

Из этого можно сделать вывод, что хронический прием аторвастатина не изменяет параметры электрической активности кардиомиоцитов мышей. Поскольку мыши являются модельными организмами и имеют схожий с человеком метаболизм, можно судить о воздействии аторвастатина на человеческий организм. Также в дальнейших исследованиях планируется изучение ультрабыстрых (I_{Kur}) и транзиторных (I_{to}) калиевых токов (обеспечивают фазу реполяризации потенциала действия желудочковых кардиомиоцитов) для получения более подробной информации.

Литература

1. Attardo S., Musumeci O., Velardo D., Toscano A. Statins Neuromuscular Adverse Effects // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23 (15). P. 8364.

2. McIver L., Siddique M. Atorvastatin // PubMed. 2025. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613530.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-376

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ БИОДОСТУПНОСТИ ГЛАЗНОЙ СУСПЕНЗИИ 5-[5-(ТРИФТОРМЕТИЛ)-1,2-ОКСАЗОЛ-3-ИЛ]-ФУРАН-2-СУЛЬФОНАМИДА НА КРОЛИКАХ

THE STUDY OF PHARMACOKINETICS AND RELATIVE BIOAVAILABILITY OF THE OCULAR SUSPENSION OF 5-[5-(TRIFLUOROMETHYL)-1,2-OXAZOLE-3-YL]-FURAN-2-SULFONAMIDE IN RABBITS

И. И. Яичков

Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского

I. I. Yaichkov

Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky

✉ i.yaichkov@yspu.org

Аннотация

Проведено изучение системной экспозиции препарата-кандидата для терапии открытоугольной глаукомы 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (TFISA) на кроликах. Рассчитаны фармакокинетические параметры данного соединения и его метаболитов. Величина относительной биодоступности TFISA после инстилляции глазной суспензии по сравнению с внутрибрюшинным введением составила 44 %.

Abstract

The systemic exposure of candidate drug for treatment of open-angle glaucoma 5-[5-(trifluoromethyl)-1,2-oxazole-3-yl]-furan-2-sulfonamide (TFISA) was studied in rabbits. The pharmacokinetic parameters of this compound and its metabolites have been calculated. The relative bioavailability of TFISA after instillation of ocular suspension compared with intraperitoneal administration was 44 %.

Введение

TFISA — новый высокоактивный селективный ингибитор карбоангидразы II типа, который находится на стадии доклинического исследования. Он обладает местным эффектом и применяется в виде 1%-й глазной суспензии [1]. При попадании в организм TFISA метаболизируется с образованием N-гидрокси-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M1) и N-ацетил-5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида (M2). В настоящие момент выполнено изучение его фармакокинетики на крысах [2]. Перед началом клинических испытаний необходимо оценить его системную экспозицию на втором виде животных, не относящемуся к грызунам [3].

Материалы и методы

TFISA в виде 1%-й суспензии закапывался (И/Г) 6 кроликам породы советская шиншилла в каждый глаз в объеме около 80 мкл (0,55 мг/кг). Пробы крови отбирали из ушной вены до введения и через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72; 144; 216 ч после введения. Полученную плазму стабилизировали 5%-м раствором аскорбиновой кислоты для предупреждения разложения M1 и замораживали. Субстанция TFISA практически не растворяется в воде, что не позволяет выполнить его внутривенное введение. Поэтому возможно оценить только относительную биодоступность (ОБ) TFISA по сравнению с внутрибрюшинным введением (В/Б). Действующее вещество и его метаболиты способны накапливаться в эритроцитах [2]. Из-за их длительного выведения из организма ОБ исследовалась на второй группе из 6 кроликов. Суспензию ODASA вводили животным внутрибрюшинно в дозировке 0,55 мг/кг. Анализ образцов плазмы был выполнен с помощью валидированной ВЭЖХ-МС/МС-методики [2]. Для TFISA и его метаболитов рассчитывались максимальная концентрация в плазме (C_{max}), время ее достижения (T_{max}), площадь под фармакокинетической кривой от момента введения до последнего отбора проб (AUC_{0-t}), период полувыведения ЛС ($T_{1/2}$), среднее резидентное время (MRT).

Результаты

Рассчитанные в ходе исследования значения фармакокинетических параметров TFISA и продуктов его биотрансформации представлены в таблице.

© И. И. Яичков, 2025

Фармакокинетические параметры TFISA и его метаболитов в плазме кролика

Вещество	**TFISA (M ± SEM)**		**M1 (M ± SEM)**		**M2 (M ± SEM)**	
Путь введения	И/Г	В/Б	И/Г	В/Б	И/Г	В/Б
C_{max}, нг/мл	67,7 ± 4,4	152,7 ± 9,1	12,0 ± 0,8	29,2 ± 2,4	1,8 ± 0,2	4,5 ± 0,4
T_{max}, ч	3,7 ± 0,5	1,5 ± 0,1	4,3 ± 0,3	2,2 ± 0,2	4,3 ± 0,3	1,7 ± 0,1
AUC_{0-t}, нг · ч/мл	681 ± 29	1522 ± 166	135 ± 19	223 ± 27	16 ± 1	27 ± 2
$T_{1/2}$, ч	8,9 ± 0,3	14,4 ± 1,6	11,6 ± 0,6	7,2 ± 0,8	6,4 ± 0,4	6,4 ± 0,3
MRT, ч	9,4 ± 0,1	13,5 ± 1,7	11,2 ± 1,1	8,6 ± 1,0	8,7 ± 0,2	7,3 ± 0,2

Примечание: M ± SEM — среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего.

Значения C_{max} у действующего вещества и его метаболитов при терапевтическом способе применения достигаются в районе 4 ч после введения. Продолжительность $T_{1/2}$ TFISA из плазмы более чем в 5 раз короче, чем продолжительность данного параметра у крыс [2]. Это вызвано более интенсивной биотрансформацией этого соединения. Величина ОБ действующего вещества после закапывания суспензии в глаза по сравнению с внутрибрюшинной инъекцией составила 44 %. Таким образом, TFISA способен всасываться при местном применении у обоих изученных животных [2]. Поэтому в рамках первой фазы клинических испытаний данного препарата необходимо проводить исследование его фармакокинетики.

Литература

1. Sibinčić N., Kalinin S., Sharoyko V. et al. A Series of Trifluoromethylisoxazolyl- and Trifluoromethylpyrazolyl- Substituted (Hetero)aromatic Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis, and Convenient Prioritization Workflow for Further *in vivo* Studies // Medicinal Chemistry. 2023. Vol. 19 (2). P. 193–210.

2. Яичков И. И., Корсаков М. К., Шетнев А. А. и др. Разработка и валидация методики количественного определения 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида и его метаболитов в плазме лабораторных животных // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2024. Т. 13 (3). С. 219–230.

3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 944.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Abdulagatov I. M. 587
Agapkina Yu. Yu. 377
Agladze K. I. 325, 591
Ak-Lama T. A. 70
Al-Alwani Y. M. 578
Alekseeva L. A. 590
Alsalloum I. 464
Arkhipov A. A. 3, 11
Ateiah M. 72
Babenko V. V. 3
Bakhromova G. H. 74
Barulin A. V. 326
Battulina N. V. 85
Bazovkina D. V. 464
Behmard N. 580
Bobrovsky P. A. 470
Bolsheva N. L. 3, 11
Borkhert E. V. 11
Brovina K. A. 470
Bug D. S. 5,7
Cherepanov I. A. 5
Chingizova E. A. 78
Da Silva S. R. 466
Danilenko D. M. 378
Dashian M. A. 9
Deeb N. 76
Dementev S. A. 324
Deviatkin A. A. 9
Dmitriev A. A. 3, 11
Dolgasheva D. S. 583
Dolgodvorova A. A. 591
Dvorianinova E. M. 11
Dzhabrailov V. D. 325, 591
Erst A. A. 70
Etezova F. M. 582
Gadzhimuradov S. G. 587
Gafurova M. N. 587
Galimova Y. A. 85
Gaptulbarova K. A. 583
Gavrilenko A. D. 12
Gladysheva A. V. 15
González G. B. 466
Gottikh M. B. 377
Grafskaia E. N. 470
Gubina M. A. 471
Gupta V. 80
Hosseini H. 585
Hussein Z. 466, 468
Juste J. P. 466
Karitskaia P. E. 13
Karpov R. M. 325
Kharlampieva D. D. 470
Khmel O. O. 78
Kikhai T. F. 377
Kirilyuk I. A. 324
Klimina K. M. 3
Knyazkova E. A. 80
Kolobovnikova Yu. V. 589
Kolpashchikov D. M. 72, 468
Komissarov A. B. 378
Koshel E. I. 76
Kovalenko S. G. 591
Kozhevnikova D. D. 326
Kravtsova E. A. 583
Krumkacheva O. A. 324
Kuchugurin O. I. 80
Kulebyakin K. Y. 472
Kulesh P. A. 83
Kulikov A. V. 464
Kurnosenko A. V. 589
Lazarev V. N. 470
Litviakov N. V. 583
Maksumova A. M. 587
Mansour O. 378
Mantsurova K. S. 468
Manuvera V. A. 470
Markov O. V. 590
Mashkovtseva E. V. 582
Melnikova N. V. 3, 11
Mhanna R. 81
Mikheeva E. I. 80, 469
Mironova N. L. 590
Moiseev S. K. 5
Motorina D. M. 85
Mouhammad E. 76
Mozhaev A. A. 325
Nartsissov Y. R. 582
Novikov S. M. 326
Nyandwi J. 437
Nzoyikorera N. 437
Oguji C. E. 327
Omelina E. S. 85
Osinkina I. A. 15
Otinov G. D. 76
Ovechkina V. S. 325
Pattaeva M. A. 74
Petukhov A. V. 326
Petukhova N. V. 5, 7
Podarov R. A. 324
Poletika V. S. 589
Polienko Y. F. 324
Pushkova E. N. 3, 11
Putlyaeva L. V. 472
Radchenko N. S. 15
Rakhov I. A. 464
Rasulov B. A. 74
Reingardt G. V. 589
Robustova S. D. 591
Romanova S. A. 591
Rozhmina T. A. 11
Sachanka A. B. 83
Sannikova N. E. 324
Santos I. P. 466
Savagina A. D. 78
Savin I. A. 590
Sen'kova A. V. 590
Serebrennikova M. Y. 470
Seriev I. R. 327
Shahab S. N. 17
Shashkova S. V. 12
Shchur V. V. 83
Shestakov A. L. 580
Shilyagina N. Yu. 327
Sigova E. A. 11
Sindeeva M. A. 12
Skamnitskiy D. V. 327
Slotvitskiy M. M. 325, 591
Sokolova S. E. 471
Sounbuli K. 590
Stasiuk A. V. 17
Statsi M. V. 17
Sukhanov I. M. 5
Surkova E. S. 85
Tarasova I. A. 578, 580, 585
Tishkov A. V. 7
Tsvelaya V. A. 325, 591
Tsydenova I. A. 583
Turchaninova E. A. 325, 591
Urazova O. I. 589
Velegzhaninov I. O. 81, 474
Volkhin I. A. 9
Vtorushin S. V. 583
Vyatkin Y. V. 13
Wu T. X. 472

Yantsevich A. V. 83
Yashchenok A. M. 326
Yurchenko E. A. 78
Zaplavnaia S. S. 474
Zenkova M. A. 590
Zhernova D. A. 11
Zhidkova E. M. 78
Zubarev Yu. A. 3
Абакумов М. А. 158
Абдрахманова В. А. 337
Абдулкадиева М. М. 592
Абдуллаев С. А. 332
Абдуллин Т. И. 491, 529
Абелова А. П. 129
Абрамова В. А. 87
Абрамова Е. А. 594
Абрамова О. В. 730
Авдюнин Д. Д. 19
Авдонина Е. Д. 221
Авидзба В. И. 434
Агбоигба Э. Э. К. 361
Агеева В. С. 89
Агеенко А. Б. 606
Агладзе К. И. 353, 359
Аглетдинов Э. Ф. 390, 396
Адамовская А. В. 272
Азарнова Т. О. 517
Айдагулова С. В. 699
Акасов Р. А. 310, 339, 363, 371
Акберова Н. А. 48
Акберова Н. И. 65
Акимкин В. Г. 432, 620
Акино А. Д. 510
Акрамова Э. Р. 596
Аксарин А. А. 608
Аксёнов-Грибанов Д. В. 308
Аладьев С. Д. 598
Александрушкина Н. А. 148, 618, 626
Алексеева А. Ю. 91
Алексеева И. А. 93
Алексеева П. А. 95
Алексеева Ю. С. 189
Алехнович А. В. 620
Алешина Ю. А. 52, 379, 424
Алешкин А. В. 135, 620
Алибаков С. Х. 600
Алиев Т. И. 475
Алиева К. Н. 97
Алимова А. Р. 21
Алрхмун С. 477
Алсаади М. 99
Алсаллум А. 602
Алферов С. В. 199
Алферова В. А. 348
Алхиреенко Д. А. 381
Ан Л. А. 291
Андреева Е. Н. 534, 572
Андреева Л. Е. 523
Андреева Н. Ю. 99
Андрияш М. А. 462
Анисимов А. С. 479
Анисимова Н. В. 104
Анисимова О. К. 503
Антипов А. Н. 152
Антипова Н. В. 692
Антонец Д. В. 383
Антонец К. С. 23
Антонец М. Е. 383
Антонова Л. В. 726
Антонова Н. П. 197, 592
Антропова Ю. Г. 734
Антышева З. Г. 510
Анудариева А. А. 604
Анурова М. Н. 135, 219
Анферова М. С. 228
Аньков С. В. 679
Апанасевич М. В. 385
Аракелов С. А. 452
Ардашов О. В. 679
Арсентьев К. А. 665
Артемов Г. Н. 385
Артюхова С. И. 106
Асадуллина Д. Д. 600
Асаевич Т. А. 482
Асекритова А. С. 688, 742
Астахова Е. А. 510
Астрелина П. С. 102
Асякина А. С. 686
Асякина Л. К. 118
Атрошенко Д. Л. 261
Афанасьева А. Н. 513, 515
Ахова А. В. 87
Ачигечева П. Ю. 387
Бабаев М. А. 718
Бабак О. Г. 104
Бабкин И. В. 439
Бабошко Д. А. 387
Бабынин Э. В. 297
Багиров А. К. 728
Бадамшин Э. А. 55
Баженов Е. Д. 606
Баженова Ю. О. 744
Базовкина Д. В. 554
Байдакова Г. В. 486, 614
Байков И. К. 439
Байкова Ю. П. 542
Балалаева И. В. 33
Баландина А. А. 608
Баландина М. С. 106
Балханов Ю. С. 282
Баранов М. С. 539
Баранова А. А. 348
Баранова О. А. 146, 172, 314
Бардашева А. В. 253, 439
Баринова В. В. 185
Баскакова К. О. 610
Басов Н. В. 272, 612, 679
Батаева А. Д. 108
Баталова А. А. 308
Батищев О. В. 328
Бахно И. А. 489
Башарова К. С. 486, 614
Бегюм Ш. 484
Безрукова А. И. 486, 614
Белаш Е. А. 110
Беленькая С. В. 426, 566
Белов Д. В. 270
Белов Е. А. 696
Белолипская С. А. 482
Белышенко А. Ю. 308
Беляев С. Н. 270
Беляева Е. В. 345
Белянкин А. А. 112, 228
Бердиева С. Б. 390, 396
Березов Р. В. 488
Беспалов А. В. 29
Бессонов В. В. 133
Биганов Р. М. 720
Бикмулина П. Ю. 168
Благодарная Е. Д. 310
Блажко Н. В. 143
Бледных О. В. 343
Блинцов А. Н. 135
Блюменкранц Д. А. 240
Бобков Г. А. 114, 312
Богдан В. Г. 234
Богданова Ю. А. 539
Боголюбова А. Н. 345
Боголюбова И. О. 479
Бограя М. М. 677
Богрянцева М. П. 121
Боднев С. А. 383, 428, 460
Бозов К. Д. 25
Болдырева Л. В. 534
Бондаренко Н. А. 722
Боргоякова М. Б. 318, 456, 675
Борисова А. А. 116, 616
Борисова М. С. 699
Бормотов Н. И. 458
Бородина Е. Е. 118
Бороздина Н. А. 236
Бочкарева М. Д. 165, 321
Бочков Д. А. 95
Бочкова М. С. 284
Брагина Е. Е. 541
Бродовская Е. П. 129
Букатин А. С. 230
Буланов М. Д. 112
Булатова М. В. 121
Бунева В. Н. 642, 681
Буркова Е. Е. 489
Бурлак В. А. 385
Бурлаков Е. В. 57

Буслаева Е. А.....321
Бутикова Е. А. 612
Бухарина А. Ю. 432
Бушина Л. Г. 501
Бывакина А. А.....123
Быков И. М. 701
Вадехина В. В. 158
Вакуловская Н. А. 268
Валидов Ш. З. 361
Валинурова М. В. 491
Варюхина К. Ю. 125
Васильев С. А.....127
Васильева Е. С. 164
Васильева Н. С. 123, 606
Васильева О. Ю. 445
Васильева С. Г. 154
Васильева Т. И.....343
Васильева Ю. А. 195, 206
Васин А. В. 416
Васина Д. В. 197, 592
Васиховская В. А. 390
Вахитов Д. И. 318, 493
Вахтинский В. М. 495, 568
Вдовина Т. В.....297
Ведерников Д. Н. 304
Ведунова М. В.....738
Вейко Н. Н. 558
Вейко Р. В. 541
Величко А. Ю.....143
Ветрова А. Н. 392
Видуто В. Е. 608
Викторов Д. А. 263
Виниченко В. Б. 23
Вишнякова П. А. 499
Владимирова Е. В. 146
Власенкова Р. А. 48
Власов А. А. 339
Власова Т. И. 129
Водопетова М. А. 618, 626
Воевода М. И.....636
Войнаровский В. В. 131
Волков В. В. 133
Волкова Е. С. 195
Волкова Н. А. 139
Волкова Н. В.....244
Волосникова Е. А.....150, 242, 244
Волошин Н. С.....25
Волчков П. Ю. 510
Волчо К. П. 679, 699
Вольных А. А. 276
Воробьев А. М. 135, 620
Воробьева А. А. 135, 620
Воробьева М. А.....707, 722
Воронова С. С. 677
Вульф М. А. 677
Выходцева А. В. 432
Вышегуров С. Х. 143
Габашвили А. Н. 148
Габбасов Р. З. 27
Гаджикурбанов М. Н. 414
Гайнуллина Д. Х. 596
Гайслер Е. В. 272
Галабурдина Е. С. 497
Галимова Ю. А. 534
Ганцова Е. А. 499
Гапизова Х. Ф.-К. 387
Гапоненко И. Н. 189
Гапурова А. Х. 622, 728
Гараева Н. С. 361
Гаршинина А. В. 416
Гашникова М. П. 405
Гашникова Н. М. 387, 405, 430
Генералова А. Н. 363
Герасимов О. А. 501
Герасимова Т. П. 523
Герцен М. М. 137
Гилевская К. С. 211
Гладких Е. С. 624
Гладких И. Н. 236, 703
Гладышева А. В.....215, 373, 381
Глазьева В. С. 618, 626
Глухов А. И.....552
Глущенко А. Г.....394
Глущенков В. А. 343
Глыбочко П. В. 477
Гогина Я. С. 242
Голикова Е. А. 477
Голикова М. В. 97
Головачева У. Е.....628
Головина Д. И.....261
Головкин А. А. 29
Головкин А. С. 510
Голубев А. А. 268
Голубчиков Д. О. 168
Голышев В. М. 352
Гольдберг М. А. 671
Гончаров С. Е. 432
Гончарова А. С. 513, 515
Гопаца Г. В. 437
Горбунов К. С. 259
Горохова А. В. 54
Горухчиева Ф. А. 434
Горюшко И. М. 503
Готфрид Л. Г. 387, 405, 430
Граб А. Е. 657
Гражданцева А. А. 399
Григорьев И. В. 197
Григорьев М. Е. 337
Григорьева А. Е. 253
Григорьева Е. В. 486
Григорьева О. А. 25
Григорьева Т. В. 248
Григорьева Э. В. 598
Гридина М. М. 650
Гриневич А. А. 716
Гринь О. О. 718
Гришаева А. А. 394
Грищук Я. К. 630
Громова Е. С. 505
Гроусова Д. М. 412
Грудина В. С. 452
Грязнов В. А. 359
Гуватова З. Г. 525
Гунбин К. В. 55
Гурина О. И. 730
Гурская Н. Г. 663
Гусев К. А. 156, 632
Гусева Т. С. 592
Давидюк Ю. Н. 99, 403
Давыдова О. К. 337
Дадали Ю. В. 304
Дандамаев Д. К. 387
Даниленко Д. М. 410
Даниленко Е. Д. 150, 242
Данилов Л. Г. 23, 31
Данилова А. А. 632
Данилова Ю. В. 206
Данильченко В. Ю. 508
Дарнотук Е. С. 314
Даудова М. Г. 387
Дашинимаев Э. Б. 282
Дегирменджи Э. Т. 139
Дегтярев И. А. 140
Дедков В. 484
Дедова А. В. 197
Деева А. А. 341
Дейнеко Д. В. 671
Деменков П. С. 66
Демина Д. С. 390, 396
Демирел Р. 634
Демченко А. Г. 541
Дениева З. Г. 328
Денисов Е. В. 36, 55, 385
Деркаев А. А. 232, 556
Деркач С. Р. 238
Дерявко Ю. В. 703
Десяткин А. А. 143
Деулин И. Ю. 636
Дёрко А. А. 385, 462
Джалилова Д. Ш. 562, 564, 718
Джарулаева А. Ш. 495
Джуманиязова И. Х. 316, 746
Дзагурова Т. К. 392
Дзантиев Б. Б. 255
Диатроптова М. А. 718
Диброва Д. В. 44
Дмитриева М. Е. 308
Дмитриенко Е. В. 145, 224, 295, 350
Добрынин С. А. 350
Довгий М. А. 232, 556
Довыденко И. С. 489
Долгова А. 484
Должикова И. В. 412

Долина С. П. 145
Долинер Н. Д. 620
Дольникова Г. А. 154
Домашева О. Ю. 501
Домнин П. А. 592
Донников М. Ю. 608, 622, 667, 713
Донцова К. А. 176
Доронькина А. С. 234
Драчкова И. А. 428, 460
Дресвянникова А. А. 148
Дрозд Е. В. 104
Дроков Д. В. 399
Друсалевич О. В. 330
Дубовицкий Н. А. 385, 462
Дубовский П. В. 348
Дубровская Э. В. 401
Дудаев А. Е. 174
Дунин-Барковский В. Л. 375
Душенко М. В. 332
Дьяченко И. А. 236
Дюдеева Е. С. 422
Дюкина А. Р. 716
Евграфова Э. А. 221
Евдокимов В. С. 118
Еврейская А. А. 165
Евстратова А. Ю. 146
Егораева А. А. 505, 638
Егорова А. Е. 510
Егорова И. Е. 148
Егорова М. С. 392
Егорова Т. В. 116, 339, 363, 371
Едер В. А. 410
Ежелев С. А. 150
Екушов В. Е. 430
Елбоева П. И. 403
Елфимов К. А. 387, 405, 430
Ельчанинов А. В. 499
Емельянова Е. П. 640
Еникеева К. И. 596
Ергешов А. А. 491
Ермаков Е. А. 642, 681
Ермакова Г. А. 701
Ермолаева Д. О. 513, 515
Ермоленко А. А. 57
Ерохина Е. Г. 644
Ерхова К. А. 517
Ершова Е. С. 558
Ершова Н. М. 21
Есина Т. И. 150, 242, 244
Есмагамбетов И. Б. 232, 556
Ефименко Б. Э. 55
Ефимова О. Г. 620
Ефремова А. Д. 152
Жданов Д. Д. 91
Жежера М. 536
Железнова А. С. 408, 454
Желтухина А. И. 410
Жердев А. В. 255
Жукова Ю. В. 560
Забелина Д. С. 390
Забродская Я. А. 416
Заварыкина А. В. 335
Задворных Д. А. 253
Зайкова О. Н. 434
Зайковская А. В. 420
Зайнутдинов С. С. 420
Зайцев П. А. 154
Зайцева А. А. 154
Зайцева Ю. А. 31
Закалюкина Ю. В. 95
Закирьянова Г. Т. 27
Заморина С. А. 284
Замотаева Т. Л. 646
Запевалов А. Т. 135
Зарайский А. Г. 663
Зарытова В. Ф. 443, 447, 449
Захарова Е. Ю. 486, 614
Зенкова А. К. 165
Зенкова М. А. 634
Зерний Е. Ю. 482
Зернов Н. 684
Зиновьева А. А. 655
Золотарева А. С. 648
Зоркина Я. А. 730
Зорков И. Д. 412
Зубков Е. А. 730
Зубков Ф. И. 426
Зубкова Е. С. 135, 219, 620
Зубкова О. В. 412
Зыбинская П. А. 50
Зырянова Д. П. 430
Ибрагимова А. А. 36
Ибрагимова М. К. 736
Иванисенко В. А. 57, 272
Иванов А. М. 650
Иванов А. С. 156
Иванов В. К. 558
Иванов И. Ю. 116
Иванова А. В. 158
Иванова А. Е. 95
Иванова О. Е. 240
Иванощук Д. Е. 508, 688
Иваньков А. И. 361
Ивашкевич Д. Н. 505, 638
Ивкин Д. Ю. 189
Игнатьев Г. М. 452
Игнатьева М. В. 282
Ильницкая В. В. 160
Ильюхин О. Е. 482
Илюхина А. А. 412
Иматдинов А. Р. 475
Иматдинов И. Р. 401, 422, 475
Имидоева Н. А. 308
Имшинецкий И. М. 696
Иншакова А. М. 172, 314
Иомдина Е. Н. 482
Ионов Я. А. 162, 185
Иркитова А. Н. 272
Исаев Д. Л. 135
Исаева Ю. А. 310
Исакова-Сивак И. Н. 441
Исламов Р. Р. 164
Ишемгулов А. Т. 337
Ишкаева Р. А. 491
Ишметова Д. В. 740
Кабве Э. 99, 403
Кабдеш И. М. 521
Кагирова Э. М. 600
Казаков Е. П. 519
Казакова А. В. 102
Казакова А. С. 165
Калацкая Ж. Н. 211
Калачева Е. А. 286
Калинчук А. Ю. 653
Калянова А. С. 414
Калёнов С. В. 183
Камальдинова Д. Р. 521
Каманина О. А. 250
Камарова К. А. 21
Камарян В. С. 684
Каменева Л. В. 558
Каменков С. С. 655
Кан А. 657
Каночкина М. С. 265
Капитонова М. 484
Капустина Ю. А. 282
Карагяур М. Н. 25
Карбышев М. С. 610
Каргалинина К. Г. 626
Карганова Г. Г. 414
Кардош А. В. 168
Кареткин Б. А. 178, 278
Карнаухова В. О. 659
Карпенко Л. И. 202, 276, 291, 318, 418, 456, 493, 675
Карпов А. П. 232
Карпова Е. А. 445
Карпушин М. Ю. 33
Карташов М. Ю. 408, 437, 454
Каспаров А. К. 345
Кахина Харкин М. Э. 452
Качан В. С. 359
Кветкина А. Н. 217, 703
Килин М. 657
Кильчевский А. В. 104
Киреев И. И. 519, 546
Киренская В. В. 416
Кириленко К. М. 36
Кириллов В. М. 564
Кирилюк И. А. 350
Киричук Н. Н. 208
Кисаков Д. Н. 291, 456, 493, 675
Кисакова Л. А. 291, 318, 456

Киселев А. В. 661
Киселева И. А. 135, 620
Киселева Я. С. 510
Киян Т. А. 541
Клейменов С. Ю. 544
Климанова Е. А. 38
Климович А. А. 236, 703
Клыков В. В. 228
Кобякова М. И. 690
Ковалев А. В. 170
Коваленко Л. В. 667, 713
Коваль В. В. 722
Ковальчук С. И. 330
Ковшова Т. С. 286
Козлов И. Б. 501
Козлов О. Н. 116
Козлов С. А. 236
Козлова А. Д. 521
Козлова М. В. 445
Козлова О. А. 172, 314
Козлова Ю. Н. 439
Койчуев Х. Г. 387
Кокаева И. С. 330
Коленчукова О. А. 357
Колмогоров Ф. С. 112, 228
Колосов П. В. 576
Колыхалов Д. А. 193
Кольченко А. М. 339
Колян А. С. 341
Комаров А. А. 174
Комарова Т. В. 21
Комиссаров А. Б. 410
Комлев А. С. 146
Кондратьева Е. И. 541
Кондрашов Б. С. 176
Конникова М. Р. 365
Коновалова С. П. 665
Копылова Д. А. 343
Коренская А. Е. 63
Коржанова М. 410
Корноухова О. Д. 178, 278
Коробова Е. В. 412
Королев М. А. 707
Короленя В. А. 40
Корчевец Е. А. 156
Корчуганова Е. А. 482
Коснырев А. С. 181
Костюк С. В. 558
Косых А. В. 663
Котова Ю. А. 715
Коток А. Ю. 523
Коханенко А. А. 385
Коцур Ю. М. 156
Кочнева Г. В. 399, 420, 606
Кочукова К. А. 183
Кошпаева Е. С. 306
Кравцова Е. А. 736
Кравченко С. В. 665
Крайнова Д. В. 185
Крайнова Ю. Д. 667
Красникова С. И. 418
Краснова О. А. 669
Краснова С. А. 539
Кручинина А. Д. 187
Крылов П. А. 50
Крылова А. И. 228
Крюков А. А. 527
Крюков В. Ю. 383
Кубекина М. В. 542
Кудашева Э. Р. 525
Кудров Г. А. 420
Кудрявцева А. А. 488
Кудряшова Т. Р. 527
Кузнецов А. В. 355
Кузнецов А. И. 42
Кузнецова Е. В. 529
Кузнецова М. В. 499
Кузьмицкая А. А. 183
Кузьмичев П. К. 610
Кузяева В. И. 363
Кулебякин К. Ю. 25, 655, 732, 734
Куленич В. В. 724
Куликов В. В. 530
Кульчановская Д. С. 156, 189
Курашова С. С. 392
Курганский И. М. 191
Курилин В. В. 477
Куркова К. И. 671
Курочкин И. Н. 644
Кутырев И. А. 44
Кутырев И. В. 437
Кутырева Л. И. 44
Куцерубова Н. С. 121
Кучмурадов К. А. 131
Кучур О. А. 692
Кушакова Д. Ш. 390
Кылбанова Е. С. 688, 742
Лаврик И. Н. 361
Лаврушкина С. В. 546
Лазарева П. А. 158
Лаишевцев А. И. 219
Лайков А. В. 248
Ланцова Е. А. 193
Лапшин К. А. 399
Лапшина К. К. 544, 673
Ларионов М. М. 532
Ласточкина Е. Э. 195
Лаушкина В. О. 189
Лебедев Т. Д. 537
Левина А. С. 443, 447, 449
Левковская Г. М. 345
Легкодымов А. А. 399
Лейченко Е. В. 217, 236, 242, 703
Лемешева В. С. 452
Лендел А. М. 197
Леонова А. С. 288
Лепикаш Р. В. 199
Лепик К. В. 189
Ле Т. Ч. 740
Летута С. Н. 337
Летягина А. Е. 534
Лешенкова А. В. 54
Липатова О. Е. 308
Лисицын С. Н. 345
Литвиненко В. В. 592
Литвинова В. Р. 318, 675
Литвинова Л. С. 677
Литов А. Г. 414
Ли Ц. 46
Лобакова Е. С. 154
Логинова А. А. 152
Ложков А. А. 416
Локтев В. Б. 456
Ломзов А. А. 352
Лоос Д. М. 36
Лопатин М. М. 677
Лопатникова Ю. А. 477, 560, 602
Лосич М. А. 434
Лукашев А. Н. 52, 379
Лупанова И. А. 280
Лупоносов Ю. Н. 310
Лысенко А. Ю. 272
Лысенко М. К. 679
Ляпин П. К. 422
Магомедова Э. М. 667
Мадонов К. С. 129
Маймистов Д. Н. 156, 632
Макаревич Е. В. 443, 445, 447, 449
Макаревич П. И. 618, 626
Макаров В. А. 730
Макаров Д. А. 240
Макарова А.-Л. А. 57
Макарова И. В. 523
Макарова К. П. 202, 318
Макарова М. Н. 304, 711
Макарова О. В. 562, 564, 718
Макашова В. В. 394
Макеев М. А. 204
Макичян А. Т. 684
Маковская А. М. 628
Малеева А. В. 698
Малиновская Ю. А. 286
Маличава М. М. 424
Малыгина Е. В. 308
Мальбахова И. А. 145
Малюкова Л. С. 574
Мамчур А. А. 206
Манжуло И. В. 505, 638, 696
Манухов И. В. 488
Маньковская С. В. 234
Маренина М. К. 426
Маркевич П. С. 620
Марков Д. Д. 523

Мартинович Г. Г. 131
Мартинович И. В. 131
Мартиновская Н. А. 104
Мартынова Е. В. 99
Мартюшова В. Г. 536
Маслов Д. Е. 390, 396
Маслов М. А. 634
Матвеева И. Н. 127
Матичина А. А. 711
Матюшенко А. М. 544
Машталяр Д. В. 696
Медведев Е. В. 48
Медведев М. С. 359
Меламуд М. М. 642, 681
Мелентьева Д. М. 684
Мелехин В. В. 59
Мелконян К. И. 686
Мельников П. А. 286
Мельченко М. А. 612
Ментова А. А. 165
Менчинская Е. С. 274
Меньщиков К. А. 705
Меньщиков М. К. 705
Местникова С. С. 688, 742
Мешкова Ю. В. 426
Мещерякова Е. И. 690
Милентьева И. С. 293
Милетина О. О. 692
Милюхина И. В. 614
Минаев Е. Я. 146
Миндубаев А. З. 297
Миронов В. Ф. 529
Миронов П. А. 348
Мирошниченко С. К. 634
Митин Д. Е. 350
Михеева А. М. 537
Мокроносов М. С. 428, 460
Монахова А. А. 694, 695
Монстакова Т. В. 517
Мордкович Н. Н. 152
Морозик Е. Г. 679
Морозкина А. В. 608, 622, 667, 713
Морозова А. Ю. 730
Морозова В. В. 145
Морозова Е. В. 620
Морозова Ф. В. 352
Москалев А. А. 525
Мотовилова Н. Г. 242
Музурова В. В. 441
Мукминов М. Н. 306
Мурзин А. И. 430
Мусабаев Э. И. 390
Муслимов А. Р. 156, 189
Мустафин Д. А. 539
Мустафина С. В. 508
Мухамадеев Р. Р. 600
Мухамедшина Я. О. 521
Мякишева С. Н. 716
Надараиа К. В. 696
Надараиа М. А. 696
Надтока М. И. 432
Назаров К. В. 477
Назарова А. Г. 541
Назарова Е. А. 162, 185
Найденышева З. К. 698
Найк А. 118
Наместникова Д. Д. 148
Намсрайн С. Г. 282
Нарыжная Н. В. 657
Насибов Т. Ф. 54
Насыров Т. Р. 403
Невинский Г. А. 571, 642
Неганова И. Э. 669
Незнамов А. Н. 542
Немтарев А. В. 529
Ненашева В. В. 523
Неруш М. О. 156
Нестеренко Л. Е. 208
Нетесов С. В. 396, 390
Нефёдова В. В. 544, 673
Нечаева Е. А. 121
Нечаева И. А. 288
Низамов И. С. 491
Низовцева И. Г. 63
Никитенко В. Д. 268
Никитин П. И. 148
Николаев Н. А. 365
Николайчук В. В. 211
Никольская Е. Д. 644
Никонова А. Э. 434
Никулин А. Д. 361
Новикова Н. Н. 482
Новикова Т. С. 642
Нугаев Э. Р. 268
Обозный А. А. 552
Овсянникова А. К. 508
Овчинников И. А. 211
Овчинникова Э. Ю. 703
Оганесян О. Г. 482
Огиенко А. А. 534
Одинокова И. В. 690
Окорокова Н. А. 152
Олейников А. А. 50
Омелина Е. С. 534
Омелько Н. А. 213
Омельченко В. О. 722
Онхонова Г. С. 401
Осадчая П. Д. 68
Осинкина И. А. 215
Осипов А. Н. 332
Осипов И. Д. 390, 396
Осипова В. Р. 546
Осипова И. П. 387
Оскорбин И. П. 497
Осмаков Д. И. 236
Оськина А. С. 437
Отводникова Д. Е. 548
Охрименко И. П. 610
Павленко А. П. 217
Павлов В. Н. 596, 600, 740
Павлова А. В. 679, 688, 742
Павлова С. В. 486
Панова А. В. 116
Панфилов В. И. 278
Папонов Б. В. 548
Паравина Е. В. 204
Парчайкина М. В. 335
Паршина О. В. 592
Пасивкина М. А. 135, 219, 620
Патрушев М. В. 361
Патрушев Ю. В. 612
Патышева М. Р. 36
Пацкан И. А. 653
Пашинцев Г. С. 359
Пашкова А. И. 550
Первойкина К. А. 221
Переверзев И. М. 489
Переломов Л. В. 137
Перелыгин Ф. С. 52
Пересадина А. В. 432
Перик-Заводская О. Ю. 477
Перик-Заводский Р. Ю. 477
Петров А. В. 181
Петров К. Д. 224
Петрова А. А. 226
Петрова Ю. В. 102
Петухова Т. Е. 291
Пильщикова К. А. 628
Писарева М. М. 410
Питухин М. П. 699
Плетюхина Ю. В. 228, 452
Плешаков П. С. 230
Плешакова Е. В. 125
Плешкова А. И. 696
Погодаева С. С. 692
Подтуркина А. В. 679
Позднякова Л. Л. 396
Покровский А. Г. 272, 612, 679
Политко М. О. 598
Половкова О. Г. 454
Поляков Д. Н. 228, 452
Полянский Д. С. 232
Пометун А. А. 152
Пономарев К. Ю. 699
Пономарёв А. Л. 439
Пономаренко А. И. 505
Попадьин К. Ю. 55
Попичева Е. А. 234
Попкова Д. В. 236, 703
Попов А. А. 650
Попов К. А. 701
Попова В. К. 295
Попова Н. Г. 624
Попова П. А. 187

Попугаева Е. А. 684
Потешкина В. А. 238
Прасолов В. С. 537
Прийменко Н. А. 703
Прокопенко П. И. 441
Прокопов А. Ю. 594
Прокофьев В. В. 232
Пронина А. А. 426
Проскурнина Е. В. 558
Протопопова Е. В. 456
Прохоров Д. И. 172, 314
Проценко М. А. 443, 445, 447, 449
Прудникова Е. Ю. 475
Прусаков Р. З. 568
Псурцева Н. В. 304
Путляев Е. В. 25
Пушкарева Ю. Г. 458
Пчелина С. Н. 486, 614
Пчелинцев М. И. 176, 552, 705
Пшеничная Н. Ю. 437
Пырсиков А. С. 240
Рабдано С. О. 112, 228, 452
Рабданова Н. П. 282
Раднаева А. В. 618
Разумов И. А. 612
Рак А. Я. 441
Ральченко И. В. 369
Рар А. А. 242, 244
Расторгуева Е. В. 263
Рахматуллина А. И. 740
Ребус М. Е. 443, 445, 447, 449
Ревин В. В. 335
Ревина Э. С. 335
Резайкин А. В. 63
Репкова М. Н. 443, 447, 449
Решетникова А. В. 238
Рзянкин О. С. 246
Ризванов А. А. 99
Риппинен Д. В. 671, 707
Рогачев А. В. 361
Рогачев А. Д. 272, 612, 679
Рогова Е. Д. 112
Рогожин Е. А. 89
Роденко Н. А. 343
Родионов Е. О. 36
Родникова Е. М. 437
Родный А. Я. 554
Роев Г. В. 432
Романов А. С. 452
Романова В. А. 248
Роцкая У. Н. 383
Рубель М. С. 114
Рудакова Н. Л. 195
Рудометов А. П. 202, 291, 318, 418, 675
Рудометова Н. Б. ..202, 291, 318, 675
Рузанова Э. А. 112, 228
Руппель Л. Э. 353
Рыбалкина О. Ю. 291
Рыбина И. В. 594
Рыбочкин П. В. 250
Рыжкова А. Ю. 54
Рыжкова О. П. 541
Рымар О. Д. 508
Рыскина А. М. 330
Рябова Е. И. 232, 556
Рябова Е. С. 253
Рябчикова Е. И. 253
Саввинова Н. В. 709
Савельев Н. С. 228, 452
Савельева А. П. 228, 452
Савинова Е. А. 558
Савинова Т. А. 259
Савицкий М. А. 355
Савостьянова Т. А. 560
Савченко Я. Ю. 21
Саенко Ю. С. 139
Салахиева Д. В. 491, 529
Салахутдинов Н. Ф. 458, 612, 679
Салихова Т. И. 529
Салищева О. В. 246
Салмин А. В. 640
Салопонова А. Е. 711
Сальседо М. Р. К. 357
Самарина Л. С. 574
Самохвалов А. В. 255
Самсонова Ж. В. 679
Санчес-Пиментель А. П. 426
Сапарова В. Б. 513, 515
Саркисова В. А. 148
Саушкин Н. Ю. 679
Сафронова М. Л. 713, 728
Саченко А. Б. 234
Свирин К. А. 408, 454
Святченко В. А. 456
Седых С. Е. 176, 536
Селиванов П. А. 257
Селло Е. О. 259
Сельменских Т. А. 513, 515
Селятицкая В. Г. 636
Семаев С. Е. 688
Семенова А. В. 399
Семенова О. В. 640
Семенова П. И. 669
Сенников С. В. 477, 560, 602
Сенокосова Е. А. 726
Серазетдинова Ю. Р. 118
Сергеев А. А. 420, 437
Сергеев Ал. А. 437
Сергеев Е. П. 261
Сергеева О. А. 720
Сергеева О. С. 715
Серебров Е. И. 270
Серов Д. А. 716
Сивай М. В. 428
Сивкова Д. С. 369
Сидорова М. С. 716
Сизиков А. Э. 642
Силина М. В. 562, 564, 718
Синицина А. П. 375, 353, 659, 720
Синцова О. В. 236
Ситников П. К. 616
Скуднов А. В. 55
Слажнева Н. А. 722
Слесарев Г. П. 594
Слонова Д. А. 592
Слотвицкий М. М. 359, 659
Сметанина М. А. 40
Смирнихина С. А. 541
Смирнова И. А. 263
Смирнова С. С. 19
Смолко Н. А. 521
Смольянова Н. А. 361
Соболева С. Е. 550
Собянин К. А. 592
Согомонян К. С. 23
Созарукова М. М. 558
Соколов Д. К. 598
Соколов И. Р. 265
Соколова А. С. 458
Соколова Т. С. 724
Сокольникова Л. В. 164
Соловий Д. О. 686
Соловченко А. Е. 154
Соловьев А. О. 268
Соловьева А. О. 671, 707
Соловьева Э. Ю. 146, 172, 314
Сопова Ю. В. 669
Сорокина И. В. 699
Сороколетова Н. А. 270
Соромотин В. Н. 250
Сотникова М. А. 272, 612
Сотникова Ю. С. 612
Сочилина А. В. 363
Старновская С. С. 274
Стародумов И. О. 63
Старостина Е. В. 318, 456, 675
Старунов В. В. 31
Стеблева Е. А. 165
Степаненко В. Н. 242
Степаненко Е. А. 523
Степанов М. Е. 339
Степанова А. А. 272, 510
Степанова Л. В. 357
Степанова М. Ю. 345
Степанчук Я. К. 650
Степченкова Е. И. 114
Стеценко Д. А. 634
Суворова Ю. М. 36
Сулейманова А. Д. 164
Султанов Р. М. 505
Султанова Д. Т. 36
Сульгин А. А. 276

Суслов Е. В. 699
Сухарева М. С. 146
Сучков М. Ю. 363
Сыровнев В. А. 720
Сысолятина Е. В. 592
Сычев К. В. 306
Сюткина В. В. 734
Табаков Д. В. 510
Тамкович С. Н. 616
Тарантул В. З. 523
Тарасов А. М. 385
Тарасова И. А. 709
Татаринова О. В. 688, 742
Таширева Л. А. 653
Творогова А. В. 116
Тедеев И. И. 228
Тельнова Т. Ю. 308
Терешин М. Н. 242
Тиванова Е. В. 620
Тигеева Е. В. 318, 456, 675
Тикунова Н. В. 145, 439
Тимашев П. С. 168, 477
Тимкачев Д. А. 178, 278
Тимофеева А. М. 46
Тимохина А. С. 280
Тимохина Т. С. 428, 460
Тишков В. И. 152
Тищенко С. А. 458
Ткаченко А. Г. 87
Ткачук В. А. 734
Товпеко Д. В. 146
Токтохоева Л. Н. 282
Толкачева В. В. 272
Толмачева А. С. 642
Толстикова Т. Г. 699
Томилова Ю. Е. 396
Топольницкий Е. Б. 36
Торгунакова Е. А. 726
Тотменин А. В. 387, 405, 430
Тощаков С. В. 361
Трахтманн Н. В. 361
Трегубчак Т. В. 428
Троицкий А. В. 636
Трубенков К. С. 428, 460
Трубников Е. С. 176
Трубникова Е. В. 644
Труфанов В. О. 566
Туйгунова Д. Б. 728
Тулуш С. С. 482
Тупицына А. В. 253
Туркия Г. Р. 170
Тутельян А. В. 620
Тутыхина И. Л. 495
Тухватулин А. И. 93
Тхи Ту Нгог Ле 178
Тымбур Г. В. 263
Тюрин-Кузьмин П. А. 25, 655
Угрюмов В. С. 568
Ульянкин Д. А. 257
Ульянова В. В. 181
Ульянова Я. С. 396
Унанян Л. С. 684
Унгур А. С. 93
Урманцев М. Ф. 600
Урусов А. Е. 571
Усанина Д. И. 284
Усачев Е. В. 197
Усачев К. С. 361
Усачёв В. А. 25, 732
Усенко Т. С. 486, 614
Ускова И. В. 238
Усова С. В. 121
Устьянцева Д. С. 365
Ушакова В. М. 730
Ушакова Т. А. 145
Фаворская И. А. 93
Фадеев А. В. 410
Фадеев Р. С. 690
Файзуллина Р. А. 521
Фаустова Н. М. 304, 711
Федин А. И. 146, 172, 314
Федоров А. А. 36
Федорова А. М. 293
Федорова Е. С. 454
Федорова О. С. 724
Федоровский А. П. 732
Федотова И. В. 367
Филатов Н. А. 230
Филин А. А. 286
Филипенко М. Л. 40, 497
Филиппова А. С. 288
Филиппова А. Ю. 679
Филиппова Д. А. 291
Филиппова Е. И. 443, 445, 447, 449
Филиппова Ю. Г. 477, 602
Филюшин М. А. 532
Фишер М. С. 477, 602
Фишман В. С. 650
Флисюк Е. В. 632
Фоменко И. А. 140
Фрейнкман О. В. 185
Фролова А. С. 293
Хажина С. И. 27
Хайбуллина С. Ф. 99
Хайдуков Е. В. 339
Халиков М. Р. 430
Халимов Р. И. 213
Хасанова А. А. 297
Хасанов Б. Р. 295
Хасаншина З. Р. 165, 321
Хафизов К. Ф. 394, 432
Хвостов М. В. 426
Хозяинова А. А. 385
Хорчун А. Б. 462
Хоссаин Р. М. 556
Хохлов А. Л. 661
Храмова Е. П. 445
Хромова Н. Ю. 178, 278
Худякова Ю. В. 274
Царенкова Е. А. 653
Цатурян Г. А. 299
Цвелая В. А. 353, 359, 375, 659, 720
Цветков И. С. 562
Цейликман Д.-М. В. 57
Центалович Ю. П. 604
Цибульников С. В. 168
Цыбденова А. П. 282
Цыденешиева Ж. Л. 301
Цымбал С. А. 548
Чавчавадзе Е. С. 345
Чанышев М. Д. 394
Часовских Н. Ю. 68
Чеканов А. В. 146, 172, 314
Челобанов Б. П. 449
Чепис М. В. 369
Черендина К. П. 554
Черкасова О. П. 365
Черкашин Е. А. 646
Чернышева А. Е. 59
Чернышенко В. С. 304
Чернышова А. С. 394
Черняев И. С. 291
Чечехин В. И. 61, 655, 734
Чечехина Е. С. 25, 61, 655, 734
Чигирева А. А. 63
Чмелюк Н. С. 158
Чубаров А. С. 224
Чуркин М. И. 204
Шагабудинова А. К. 736
Шайдуллина А. Р. 65
Шакирова А. И. 189
Шакирова В. Г. 99
Шалдаева Т. М. 445
Шамаев Н. Д. 306
Шаньгина П. А. 602
Шарабрин С. В. 418
Шардина К. Ю. 284
Шарипова М. Р. 195, 206
Шарифьянова Ю. В. 596
Шарлаева Е. А. 576
Шаршов К. А. 385, 462
Шастина Н. С. 146, 172, 314
Шатунова Е. А. 722
Шахбанова З. Р. 387
Шахтшнейдер Е. В. 508, 688
Шашнин Д. Д. 738
Шаяхметов Р. И. 740
Шварц Я. Ш. 640
Шебардина Н. Г. 482
Шевелёва М. П. 482
Шевченко А. Д. 572
Шевченко Ю. А. 477, 602

Шелепин Н. А. 33
Шелковникова В. Н. 308
Шелудяков Н. А. 66
Шелухина И. В. 330
Шенкарев З. О. 348
Шершнева А. В. 626
Шестаков М. В. 170
Шестакова Е. Е. 68
Шестопалов А. М. 385
Шешукова Е. В. 21
Шилин С. А. 257
Шимина Г. Г. 150
Шипелова А. В. 314
Шипунова В. О. 648
Шишацкая Е. И. 174
Шишкин М. Л. 482
Шишкина Л. Н. 443, 445, 447, 449, 458
Шишпарёнок А. Н. 91
Шкрыль Ю. Н. 301
Шмаков С. В. 230
Шмаров М. М. 495
Шматов Ф. М. 23
Шмелькова П. Н. 596
Шокина В. А. 698
Шпичка А. И. 168
Шрам П. П. 371
Шувалова А. А. 189
Шульгина И. С. 420
Шумицкая А. А. 310
Шуралев Э. А. 306
Шурыгин Б. М. 154
Шхалахова Р. М. 574
Щебляков Д. В. 93, 232, 556
Щекутьева Е. О. 312
Щелконогов В. А. 146, 172, 314
Щербаков А. И. 437
Щербаков Д. Н. 110, 150, 204, 213, 244, 272, 426, 530, 576
Щербатова Н. А. 523
Щербинин Д. Н. 221
Щур В. В. 234
Эверстова С. С. 688, 742
Эпова Е. Ю. 644
Югай Ю. А. 301
Юрков А. П. 527
Юрченко А. Н. 208, 274
Юрченко Е. А. 208, 274
Юрченко К. А. 139
Юсупов М. М. 361
Юсупов Р. В. 181
Ягина А. В. 744
Ягодницына А. А. 170
Яголович Е. И. 316, 746
Яичков И. И. 748
Яковлев В. А. 318, 456, 675
Яковлева К. И. 489
Якушева Е. А. 576
Янковская С. В. 636
Янцевич А. В. 234
Яншин А. О. 373
Яньшоле В. В. 604
Яровая О. И. 426
Яровикова М. С. 321
Яровой А. С. 375
Яцевич К. К. 104
Ячменева А. А. 228, 452

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел I. **Биоинформатика**

Arkhipov A. A., Pushkova E. N., Bolsheva N. L., Babenko V. V., Klimina K. M., Zubarev Yu. A., Melnikova N. V., Dmitriev A. A.
Assembly of complete sea buckthorn genome using nanopore sequencing and the Hifiasm ONT algorithm 3
Bug D. S., Sukhanov I. M., Cherepanov I. A., Moiseev S. K., Petukhova N. V.
In silico analysis of the mesocarb-type molecules interaction with the dopamine transporter as potential anti-autoimmune agents 5
Bug D. S., Tishkov A. V., Petukhova N. V. Identification of evolutionarily tolerated genetic variants using pseudoreads of orthologous sequences 7
Dashian M. A., Volkhin I. A., Deviatkin A. A. Genotypic differentiation and evolutionary dynamics of *puumala orthohantavirus* (PUUV) 9
Dvorianinova E. M., Arkhipov A. A., Bolsheva N. L., Pushkova E. N., Rozhmina T. A., Borkhert E. V., Sigova E. A., Zhernova D. A., Melnikova N. V., Dmitriev A. A.
Comparative analysis of chromosome-level flax genome assemblies from R9 Nanopore data 11
Gavrilenko A. D., Sindeeva M. A., Shashkova S. V. Prediction cytokine-inducing epitopes using protein language models 12
Karitskaia P. E., Vyatkin Y. V. Development of a method for predicting chromothripsis in the human genome using machine learning algorithms 13
Radchenko N. S., Osinkina I. A., Gladysheva A. V. AlphaFold 3-Based structural annotation of Haseki tick virus nonstructural proteins 15
Statsi M. V., Shahab S. N., Stasiuk A. V. Molecular docking of flavonoids Isorhamnetin and Myricetin with Parkinson's-related targets 17
Авдюнин Д. Д., Смирнова С. С. Биоинформационный анализ геномной изменчивости *Acinetobacter baumannii*, циркулирующих в инфекционном госпитале: полногеномное MLST- и cgMLST-типирование 19
Алимова А. Р., Савченко Я. Ю., Ершова Н. М., Камарова К. А., Шешукова Е. В., Комарова Т. В. Идентификация белков, содержащих домен B3, в растении *Nicotiana benthamiana* и анализ профиля экспрессии их генов 21
Виниченко В. Б., Согомонян К. С., Шматов Ф. М., Данилов Л. Г., Антонец К. С.
Анализ распределения метаболических путей в пангеноме бактерий, несущих ген *luxR* 23
Волошин Н. С., Путляев Е. В., Чечехина Е. С., Усачёв В. А., Карагяур М. Н., Бозов К. Д., Григорьева О. А., Тюрин-Кузьмин П. А., Кулебякин К. Ю.
NuclePhaser: глубокое обучение для прижизненного мониторинга клеточных популяций 25
Габбасов Р. З., Закирьянова Г. Т., Хажина С. И. Оптимизация данных в биоинформатике 27
Головкин А. А., Беспалов А. В. Разработка алгоритма на основе рекуррентных и сверточных нейронных сетей для предсказания структуры белка 29
Зайцева Ю. А., Данилов Л. Г., Старунов В. В. Выявление молекулярных механизмов адаптации мшанок к пресноводной среде обитания на основе данных RNA-Seq-экспериментов 31
Карпушин М. Ю., Шелепин Н. А., Балалаева И. В. Анализ *in silico* особенностей профиля экспрессии генов, ассоциированных с внеклеточным матриксом и фенотипической пластичностью, при трижды негативном раке молочной железы 33
Кириленко К. М., Федоров А. А., Ибрагимова А. А., Патышева М. Р., Султанова Д. Т., Родионов Е. О., Топольницкий Е. Б., Лоос Д. М., Суворова Ю. М., Денисов Е. В.
Разработка биоинформатического пайплайна для идентификации неоантигенов с целью создания персонализированной мРНК-вакцины против немелкоклеточного рака легкого 36
Климанова Е. А. Влияние полиморфизма в гене BMPR-IB на конформацию и функциональные свойства кодируемого белка 38

Короленя В. А., Филипенко М. Л., Сметанина М. А. ... 40
Поиск отличительных маркеров метилирования эндотелиальной ДНК ... 40
Кузнецов А. И. Инновационные подходы к ранней диагностике рака шейки матки: применение алгоритмов машинного обучения на основе рутинных гематологических показателей ... 42
Кутырева Л. И., Диброва Д. В., Кутырев И. А. Поиск и анализ серпинов как потенциальных иммунорегуляторов в транскриптомах ленточных червей ... 44
Ли Ц., Тимофеева А. М. Вирус клещевого энцефалита в качестве триггера аутоиммунных реакций ... 46
Медведев Е. В., Власенкова Р. А., Акберова Н. А. *In silico* моделирование пространственной структуры гликозилированного натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в различных липидных мембранах и термодинамических ансамблях ... 48
Олейников А. А., Зыбинская П. А., Крылов П. А. Молекулярная характеристика дегидринов у рода *Quercurs* ... 50
Перелыгин Ф. С., Лукашев А. Н., Алешина Ю. А. Классические алгоритмы машинного обучения и нейросети в задаче определения хозяев РНК-содержащих вирусов насекомых, млекопитающих и растений ... 52
Рыжкова А. Ю., Лешенкова А. В., Насибов Т. Ф., Горохова А. В. *In silico* анализ потенциальных молекулярных механизмов действия хелидоновой кислоты ... 54
Скуднов А. В., Бадамшин Э. А., Ефименко Б. Э., Гунбин К. В., Попадьин К. Ю., Денисов С. В. Облигатные аэробные бактерии демонстрируют более высокую частоту мутаций A>G по сравнению с анаэробами ... 55
Цейликман Д.-М. В., Бурлаков Е. В., Ермоленко А. А., Макарова А.-Л. А., Иванисенко В. А. Реконструкция генной сети посттравматического стрессового расстройства с использованием системы ANDSystem ... 57
Чернышева А. Е., Мелехин В. В. Сетевой анализ регуляции ферроптоза и глутатионовой системы в гепатоцеллюлярной карциноме ... 59
Чечехина Е. С., Чечехин В. И. Иерархическая аннотация клеток и высокоточная импутация модальностей при помощи инструмента scParadise ... 61
Чигирева А. А., Коренская А. Е., Резайкин А. В., Стародумов И. О., Низовцева И. Г. Системы защиты от бактериофагов в геномах бактерий рода *Methylococcus* ... 63
Шайдуллина А. Р., Акберова Н. И. Эффект замен остатков цистеина на аланин в большом внеклеточном домене транспортера NaPi2b на его пространственную структуру ... 65
Шелудяков Н. А., Деменков П. С. Предсказание сайтов посадки транскрипционных факторов по аминокислотным последовательностям белков с использованием методов искусственного интеллекта ... 66
Шестакова Е. Е., Часовских Н. Ю., Осадчая П. Д. Исследование взаимодействия ксантотоксина с эффекторными каспазами методом молекулярного докинга ... 68

Раздел II. **Биотехнологии**

Ak-Lama T. A., Erst A. A. *In vitro* regeneration of *Rhodiola rosea* from root explants ... 70
Ateiah M., Kolpashchikov D. M. All-DNA short oligonucleotide staple (SOS) probe for fluorescent reporting of double stranded DNA analyte at low temperatures ... 72
Bakhromova G. H., Pattaeva M. A., Rasulov B. A. HPLC-based identification of gossypol as a phytoalexin in selected cotton (*Gossypium hirsutum l.*) varieties under biotic stress conditions ... 74
Deeb N., Otinov G. D., Mouhammad E., **Koshel E. I.** Engineered *E. coli* Nissle 1917 producing azurin for targeted colorectal cancer therapy ... 76
Khmel O. O., Savagina A. D., Chingizova E. A., Zhidkova E. M., Yurchenko E. A. *Aspergillus* fungi are a source of bis-indole alkaloids with anticancer activity ... 78
Kuchugurin O. I., Gupta V., **Knyazkova E. A., Mikheeva E. I.** Methodological approaches to bacterial cellulose cultivation in the prototype development of rotating disk bioreactor ... 80
Mhanna R., Velegzhaninov I. O. Overexpression of mtDNA repair gene — MUTYH — using CRISPRa to enhance resistance to genotoxic and oxidative stress ... 81
Sachanka A. B., Kulesh P. A., Shchur V. V., Yantsevich A. V. Enzymatic activity of the fusion protein of terminal deoxynucleotidyl transferase with DNA-binding protein Sso7d from *S. solfataricus* ... 83
Surkova E. S., Galimova Y. A., Battulina N. V., Motorina D. M., Omelina E. S. Engineering a near-infrared light-inducible gene expression system for plants using BphP1-QPAS1 and LOV domains ... 85

Абрамова В. А., Ахова А. В., Ткаченко А. Г. Применение бактерий *Escherichia coli* для получения компонентов для производства биополиамидов ... 87
Агеева В. С., Рогожин Е. А. Биотехнология получения пептидных ростстимуляторов и иммуномодуляторов растений ... 89
Алексеева А. Ю., Шишпарёнок А. Н., Жданов Д. Д. Биокомпозит бактериальной целлюлозы для 3D-культивирования опухолевых клеток ... 91
Алексеева И. А., Унгур А. С., Фаворская И. А., Тухватулин А. И., Щебляков Д. В. Моноклональные однодоменные антитела, нейтрализующие токсин B *Clostridioides difficile* ... 93
Алексеева П. А., Иванова А. Е., Закалюкина Ю. В., Бочков Д. А. Антагонистический потенциал мицелиальных организмов, ассоциированных с муравьями *Lasius niger* ... 95
Алиева К. Н., Голикова М. В. Изучение и прогноз эффекта бета-лактамных антибиотиков на штаммы *Klebsiella pneumoniae* в динамической системе *in vitro* ... 97
Андреева Н. Ю., Мартынова Е. В., Давидюк Ю. Н., Алсаади М., **Шакирова В. Г., Хайбуллина С. Ф., Ризванов А. А., Кабве Э.** Разработка тест-системы для диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на основе стимуляции и оценки изменения продукции интерферона-гамма ... 99
Астрелина П. С., Петрова Ю. В., Казакова А. В. Применение статистического подхода DoE для изучения условий разрушения агрегатов Fc-слитого белка ... 102
Бабак О. Г., Дрозд Е. В., Мартиновская Н. А., Анисимова Н. В., Яцевич К. К., Кильчевский А. В. Анализ урожайности и биохимических признаков гибридов F_1 томата с комплексом аллелей, определяющих высокое накопление антоцианов и каротиноидов ... 104
Баландина М. С., Артюхова С. И. Биотехнология лиофилизированного биокорма на основе *Nauphoeta cinerea* для реабилитации птенцов насекомоядных птиц ... 106
Батаева А. Д. Антиоксидантная активность штамма *Anabaena* sp. IPPAS B-2020 ... 108
Белаш Е. А., Щербаков Д. Н. Определение кинетических характеристик рекомбинантного химозина тупайи ... 110
Белянкин А. А., Колмогоров Ф. С., Буланов М. Д., Рогова Е. Д., Рузанова Э. А., Рабдано С. О. Разработка полисахаридных конъюгированных вакцин для профилактики гемофильной, пневмококковой и менингококковой инфекций ... 112
Бобков Г. А., Рубель М. С., Степченкова Е. И. Сравнение свойств ДНК-наносенсоров на основе разных аптамеров к кристаллическому фиолетовому ... 114
Борисова А. А., Иванов И. Ю., Козлов О. Н., Творогова А. В., Егорова Т. В., Панова А. В. Создание изогенной клеточной модели с помощью CRISPR/Cas9 для оценки функции ионного канала CFTR ... 116
Бородина Е. Е., Серазетдинова Ю. Р., Найк А., **Евдокимов В. С., Асякина Л. К.** Влияния состава питательных сред на рост и продуцирование индолил-3-уксусной кислоты бактериями рода *Bacillus* ... 118
Булатова М. В., Куцерубова Н. С., Усова С. В., Богрянцева М. П., Нечаева Е. А. Сравнительный анализ ростовых свойств питательных сред для выявления микоплазм в иммунобиологических лекарственных препаратах ... 121
Бывакина А. А., Васильева Н. С. Оценка комбинированного действия онколитического вируса VV-GMCSF-Lact и ингибитора киназы Akt перифозина на клетки глиомы и микроглии человека *in vitro* ... 123
Варюхина К. Ю., Плешакова Е. В. Сравнение удаления марганца из водной среды с использованием кварцевого песка и иммобилизованных на нем клеток *Bacillus megaterium* 69.5 ... 125
Васильев С. А., Матвеева И. Н. Цирковирус свиней второго типа: стратегия по разработке рекомбинантной вакцины ... 127
Власова Т. И., Бродовская Е. П., Мадонов К. С., Абелова А. П. Изучение репаративного потенциала PRP пациентов с хроническим нарушением углеводного обмена ... 129
Войнаровский В. В., Кучмурадов К. А., Мартинович И. В., Мартинович Г. Г. Влияние стабилизаторов цитрата натрия и коллагена на каталитические свойства наночастиц диоксида церия ... 131
Волков В. В., Бессонов В. В. Субстратная модуляция активности фосфолипазы А2: выявление зависимости активности от субстрата ... 133
Воробьева А. А., Зубкова Е. С., Воробьев А. М., Пасивкина М. А., Киселева И. А., Запевалов А. Т., Анурова М. Н., Блинцов А. Н., Исаев Д. Л., Алешкин А. В. Характеризация и разработка технологии культивирования бактериофагов, перспективных для терапии и профилактики акне ... 135
Герцен М. М., Переломов Л. В. Разработка эффективных экологически чистых сорбентов антибиотиков на основе глинистых минералов ... 137

Дегирменджи Э. Т., Юрченко К. А., Волкова Н. А., Саенко Ю. С. Разработка оптимальных условий культивирования первичных фибробластов для использования в конструкциях, созданных путем биопринтинга 139
Дегтярев И. А., Фоменко И. А. *In silico* и экспериментальный подходы к оценке потенциала пептидообразования при гидролизе белков рапса 140
Десяткин А. А., Блажко Н. В., Вышегуров С. Х., Величко А. Ю. Получение рекомбинантных белков вирусов растений 143
Долина С. П., Мальбахова И. А., Ушакова Т. А., Морозова В. В., Тикунова Н. В., Дмитриенко Е. В. Синтез и исследование гидрогелей на основе сывороточного альбумина человека для доставки бактериофагов 145
Евстратова А. Ю., Минаев Е. Я., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Товпеко Д. В., Комлев А. С., Сухарева М. С., Владимирова Е. В., Соловьева Э. Ю., Федин А. И., Щелконогов В. А. Антиоксидантные свойства наночастиц с антимикробным пептидом ChBac3.4 146
Егорова И. Е., Наместникова Д. Д., Дресвянникова А. А., Саркисова В. А., Александрушкина Н. А., Никитин П. И., Габашвили А. Н. Биосинтетические белковые наночастицы как инструмент для биотехнологического применения 148
Ежелев С. А., Есина Т. И., Волосникова Е. А., Шимина Г. Г., Даниленко Е. Д., Щербаков Д. Н. Маннаны из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как перспективный адъювант для субъединичных вакцин 150
Ефремова А. Д., Логинова А. А., Мордкович Н. Н., Окорокова Н. А., Антипов А. Н., Тишков В. И., Пометун А. А. Получение и функциональная характеристика нуклеотидазы из *Limosilactobacillus reuteri* 152
Зайцев П. А., Зайцева А. А., Шурыгин Б. М., Дольникова Г. А., Васильева С. Г., Лобакова Е. С., Соловченко А. Е. Метагеномный майнинг как инструмент биоразведки микробных сообществ антропогенно нарушенных экотопов 154
Иванов А. С., Корчевец Е. А., Неруш М. О., Кульчановская Д. С., Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Коцур Ю. М., Муслимов А. Р. 156
Разработка методов контроля качества и стандартизация получения невирусных носителей мРНК на основе липидных наночастиц 156
Иванова А. В., Лазарева П. А., Чмелюк Н. С., Вадехина В. В., Абакумов М. А. Разработка НАЕЕ-функционализированных магнитных наночастиц для тераностики болезни Альцгеймера: *in vitro* и *in vivo* исследования 158
Ильницкая В. В. Биотехнологическая платформа для получения рекомбинантных нейромедиаторных ферментов с перспективой терапевтического применения в нейронауках 160
Ионов Я. А., Назарова Е. А. Биосенсорная система на основе углеродных точек и ферментов для определения качества пищевых продуктов 162
Исламов Р. Р., Васильева Е. С., Сокольникова Л. В., Сулейманова А. Д. Устойчивость штаммов *Pantoea brenneri* к тяжелым металлам 164
Казакова А. С., Еврейская А. А., Зенкова А. К., Стеблева Е. А., Ментова А. А., Хасаншина З. Р., Бочкарева М. Д. Разработка платформенной технологии транзиентной экспрессии в CHO-S 165
Кардош А. В., Бикмулина П. Ю., Голубчиков Д. О., Цибульников С. В., Шпичка А. И., Тимашев П. С. Разработка модели «кожа-на-чипе» с бактериальным консорциумом на основе сфероидов, полученных из кератиноцитов и фибробластов человека 168
Ковалев А. В., Туркия Г. Р., Шестаков М. В., Ягодницына А. А. Разработка микрофлюидных устройств сортировки для биологических приложений и вспомогательных репродуктивных технологий 170
Козлова О. А., Щелконогов В. А., Иншакова А. М., Шастина Н. С., Прохоров Д. И., Баранова О. А., Чеканов А. В., Соловьева Э. Ю., Федин А. И. Антиоксидантное действие липосом с глутатионом и кофейной кислотой 172
Комаров А. А., Дудаев А. Е., Шишацкая Е. И. Конструирование пористых биополимерных каркасов методом выщелачивания для тканевой инженерии и регенеративной медицины 174
Кондрашов Б. С., Трубников Е. С., Донцова К. А., Пчелинцев М. И., Седых С. Е. Анализ влияния почвенных бактерий на развитие сельскохозяйственных культур 176
Корноухова О. Д., Тимкачев Д. А., Тхи Ту Нгог Ле, **Кареткин Б. А., Хромова Н. Ю.** Исследование адгезивных свойств и оценка биопленкообразующей способности молочнокислых бактерий 178
Коснырев А. С., Петров А. В., Юсупов Р. В., Ульянова В. В. Оценка потенциальной деполимеризующей активности микробного консорциума, выделенного из полимерного источника 181

Кочукова К. А., Кузьмицкая А. А., Калёнов С. В. Современные биотехнологии переработки терефталата 183
Крайнова Д. В., Баринова В. В., Фрейнкман О. В., Ионов Я. А., Назарова Е. А. Получение хитина и хитозана из членистоногих для разработки биоразлагаемых материалов пищевой упаковки 185
Кручинина А. Д., Попова П. А. Лекарственное покрытие аортальных стент-графтов 187
Кульчановская Д. С., Алексеева Ю. С., Шувалова А. А., Гапоненко И. Н., Лаушкина В. О., Ивкин Д. Ю., Шакирова А. И., Лепик К. В., Муслимов А. Р. Ксенотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток человека иммунодефицитным мышам 189
Курганский И. М. Эпигенетические маркеры стресса как предикторы эффективности модификации имплицитных когнитивных установок 191
Ланцова Е. А., Колыхалов Д. А. Формирование пористых кремнийорганических материалов с использованием биотемплатов 193
Ласточкина Е. Э., Волкова Е. С., Васильева Ю. А., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Сравнительная характеристика штамма *B. subtilis* IV3 с делетированным геном бациллибактина (*dhbF*) 195
Лендел А. М., Антонова Н. П., Григорьев И. В., Дедова А. В., Усачев Е. В., Васина Д. В. Скрининг бактериолитических белков для создания новых биотехнологических антибактериальных препаратов 197
Лепикаш Р. В., Алферов С. В. Применение модифицированного катода для выработки перекиси водорода в растительном микробном топливном элементе 199
Макарова К. П., Рудометова Н. Б., Карпенко Л. И., Рудометов А. П. Получение стабилизированного Env-тримера ВИЧ-1 подтипа A6, циркулирующего в Российской Федерации 202
Макеев М. А., Чуркин М. И., Паравина Е. В., Щербаков Д. Н. Скрининг кровоостанавливающего действия биокомпозитных аэрогелей на основе хитозана 204
Мамчур А. А., Васильева Ю. А., Данилова Ю. В., Шарипова М. Р. Роль гена синтетазы бациллибактина в PGPR-свойствах штамма *Bacillus subtilis* 206
Нестеренко Л. Е., Юрченко Е. А., Киричук Н. Н., Юрченко А. Н. Изменение условий культивирования морских грибов — способ получения новых биологически активных соединений 208
Овчинников И. А., Калацкая Ж. Н., Николайчук В. В., Гилевская К. С. Особенности функционирования фотосинтетического аппарата огурца в условиях солевого стресса при обработке семян конъюгатами хитозана с оксикоричными кислотами 211
Омелько Н. А., Щербаков Д. Н., Халимов Р. И. Способ получения и физико-химические характеристики хитозана, полученного из отходов переработки цист артемии 213
Осинкина И. А., Гладышева А. В. Разработка платформы для продукции рекомбинантных белков вируса Хасеки, пригодных для структурных исследований 215
Павленко А. П., Кветкина А. Н., Лейченко Е. В. Изучение генетической стабильности штамма-продуцента анальгетического пептида 217
Пасивкина М. А., Зубкова Е. С., Анурова М. Н., Лаишевцев А. И. Комбинированная стратегия: бактериофаги и пробиотики против энтеропатогенов 219
Первойкина К. А., Авдонина Е. Д., Евграфова Э. А., Щербинин Д. Н. Повышение иммуногенности экспрессируемого аденовирусным вектором гемагглютинина вируса гриппа типа B за счет модификации цитоплазматического домена 221
Петров К. Д., Дмитриенко Е. В., Чубаров А. С. Синтез магнитных наночастиц, покрытых человеческим сывороточным альбумином и загруженных доксорубицином 224
Петрова А. А. Изучение антимикробной активности CO_2-экстрактов из растения рода *Amaranthus* 226
Плетюхина Ю. В., Савельев Н. С., Белянкин А. А., Рузанова Э. А., Поляков Д. Н., Ячменева А. А., Савельева А. П., Колмогоров Ф. С., Тедеев И. И., Крылова А. И., Клыков В. В., Анферова М. С., Рабдано С. О. Новая рекомбинантная, полисахаридная конъюгированная вакцина против менингококковой инфекции серогрупп A, B, C, W и Y 228
Плешаков П. С., Филатов Н. А., Шмаков С. В., Букатин А. С. Генерация микрофлюидных капель отрицательным давлением для синтеза альгинатных микрогелей с клетками 230
Полянский Д. С., Рябова Е. И., Деркаев А. А., Прокофьев В. В., Довгий М. А., Щебляков Д. В., Карпов А. П., Есмагамбетов И. Б. Разработка и масштабирование технологии культивирования клеточных линий, продуцирующих модифицированные однодоменные антитела 232
Попичева Е. А., Саченко А. Б., Щур В. В., Богдан В. Г., Доронькина А. С., Маньковская С. В., Янцевич А. В. Разработка комбинированной плазмидной конструкции VEGF165/Ang-1 и оценка ее влияния на восстановление функций ишемизированных конечностей в экспериментах *in vivo* 234

Попкова Д. В., Синцова О. В., Климович А. А., Бороздина Н. А., Дьяченко И. А., Осмаков Д. И., Козлов С. А., Гладких И. Н., Лейченко Е. В. Рекомбинантные ингибиторы α-амилаз млекопитающих из морской анемоны *Heteractis magnifica* в качестве эффективных пероральных средств для контроля гипергликемии при сахарном диабете 236
Потешкина В. А., Ускова И. В., Деркач С. Р., Решетникова А. В. Технология получения и применения пробиотического препарата в кормлении форели 238
Пырсиков А. С., Иванова О. Е., Макаров Д. А., Блюменкранц Д. А. Разработка микропланшетной системы для определения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков, используемых в ветеринарии 240
Рар А. А., Волосникова Е. А., Есина Т. И., Гогина Я. С., Мотовилова Н. Г., Даниленко Е. Д., Степаненко В. Н., Терешин М. Н., Лейченко Е. В. Оптимизация технологии получения анальгетического пептида HCRG21 242
Рар А. А., Волосникова Е. А., Есина Т. И., Волкова Н. В., Щербаков Д. Н. Конъюгаты белка А с антигеном усиливают иммунный ответ при интраназальном введении 244
Рзянкин О. С., Салищева О. В. К вопросу о коллоидной стабильности пищевых систем 246
Романова В. А., Григорьева Т. В., Лайков А. В. Характеристика микробиоты грунта, загрязненного мазутом в результате техногенной аварии в Краснодарском крае 248
Рыбочкин П. В., Соромотин В. Н., Каманина О. А. Применение клеток *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 для приготовления биогибридного катализатора 250
Рябова Е. С., Тупицына А. В., Бардашева А. В., Григорьева А. Е., Задворных Д. А., Рябчикова Е. И. Эффекты искусственной РНКазы $DL_4$12 на грамположительные и грамотрицательные бактерии 253
Самохвалов А. В., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. ДНК-аптамеры, связывающие низкомолекулярные соединения: изучение взаимосвязей структуры и аффинности и аналитическое применение 255
Селиванов П. А., Ульянкин Д. А., Шилин С. А. Влияние активации Т-лимфоцитов на исход свободной аутодермопластики у пациентов с ожоговой травмой 257
Селло Е. О., Горбунов К. С., Савинова Т. А. Метаанализ критериев, предъявляемых к донорам, для успешного выделения жизнеспособных культур «микробиотических» организмов 259
Сергеев Е. П., Головина Д. И., Атрошенко Д. Л. Новые полиаминоксидазы из термотолерантных дрожжей для определения полиаминов в биологических жидкостях 261
Смирнова И. А., Тымбур Г. В., Расторгуева Е. В., Викторов Д. А. Разработка методики получения армированной РНК на примере положительного контрольного образца для ПЦР-тест-системы 263
Соколов И. Р., Каночкина М. С. Разработка технологии производства напитка с пробиотическими свойствами на основе многокомпонентной закваски 265
Соловьев А. О., Никитенко В. Д., Вакуловская Н. А., Голубев А. А., Нугаев Э. Р. Современные способы очистки стоков в технологии получения этилового спирта 268
Сороколетова Н. А., Серебров Е. И., Беляев С. Н., Белов Д. В. Биовыщелачивание труднорастворимых соединений неодима микроскопическими грибами контактным методом 270
Сотникова М. А., Лысенко А. Ю., Степанова А. А., Толкачева В. В., Адамовская А. В., Басов Н. В., Иркитова А. Н., Рогачев А. Д., Гайслер Е. В., Покровский А. Г., Иванисенко В. А., Щербаков Д. Н. Экзометаболомное исследование новых штаммов дрожжей, выделенных из традиционных продуктов питания, с использованием методов анализа больших данных 272
Старновская С. С., Юрченко А. Н., Худякова Ю. В., Менчинская Е. С., Юрченко Е. А. Морской гриб *Trichoderma koningii* КММ 4751 — источник соединений с противоопухолевым потенциалом 274
Сульгин А. А., Вольных А. А., Карпенко Л. И. Разработка метода получения рекомбинантных ферментов пирофосфогидролазы и РНК-лигазы 1 для синтеза кольцевых РНК 276
Тимкачев Д. А., Корноухова О. Д., Хромова Н. Ю., Кареткин Б. А., Панфилов В. И. Исследование пребиотического потенциала этанольных экстрактов из порошков плодов черноплодной рябины и черемухи 278
Тимохина А. С., Лупанова И. А. Влияние света на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной клеточной культуры маклейи сердцевидной (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.) 280
Токтохоева Л. Н., Рабданова Н. П., Игнатьева М. В., Намсрайн С. Г., Капустина Ю. А., Цыбденова А. П., Дашинимаев Э. Б., Балханов Ю. С. Влияние лизата тромбоцитов человека на экспансию кератиноцитов линии HaCaT и их взаимодействие с коллагеновой матрицей 282
Усанина Д. И., Бочкова М. С., Шардина К. Ю., Заморина С. А. Сравнительный анализ влияния наночастиц оксида графена на продукцию цитокинов моноцитами человека и клетками линии THP-1 284

Филин А. А., Калачева Е. А., Мельников П. А., Малиновская Ю. А., Ковшова Т. С. Внутриклеточная потенциал-зависимая доставка наночастиц на основе PLGA в клетки глиом 286
Филиппова А. С., Леонова А. С., Нечаева И. А. Влияние источника углерода и стрессовых факторов на продукцию каротиноидов бактериями *Rhodococcus qingshengii* X5 288
Филиппова Д. А., Рудометова Н. Б., Кисакова Л. А., Кисаков Д. Н., Петухова Т. Е., Рыбалкина О. Ю., Ан Л. А., Черняев И. С., Рудометов А. П., Карпенко Л. И. Получение рекомбинантного эритропоэтина человека 291
Фролова А. С., Федорова А. М., Милентьева И. С. Фитохимическое исследование и оценка безопасности *Empetrum nigrum* для применения в пищевой промышленности 293
Хасанов Б. Р., Попова В. К., Дмитриенко Е. В. Разработка систем доставки синтетических нуклеиновых кислот на основе наночастиц карбоната кальция 295
Хасанова А. А., Миндубаев А. З., Бабынин Э. В., Вдовина Т. В. Способ обезвреживания желтого (белого) фосфора при помощи микроорганизмов 297
Цатурян Г. А. Особенности введения в культуру *in vitro Corylus pontica* K. Koch 299
Цыденешиева Ж. Л., Югай Ю. А., Шкрыль Ю. Н. Экзосомы растения *Nicotiana tabacum* в качестве наноплатформы таргетной доставки микроРНК 301
Чернышенко В. С., Фаустова Н. М., Дадали Ю. В., Макарова М. Н., Ведерников Д. Н., Псурцева Н. В. Сравнение антитромботической активности культуральных фильтратов и водных экстрактов мицелия базидиальных грибов *Lentinula edodes* (шиитаке) и *Flammulina velutipes* (энокитаке) при глубинном культивировании 304
Шамаев Н. Д., Шуралев Э. А., Кошпаева Е. С., Сычев К. В., Мукминов М. Н. Продуктивность *Apis mellifera* L. в Приволжском федеральном округе 306
Шелковникова В. Н., Дмитриева М. Е., Баталова А. А., Тельнова Т. Ю., Белышенко А. Ю., Малыгина Е. В., Имидоева Н. А., Липатова О. Е., Аксёнов-Грибанов Д. В. Байкальские оксифильные микроорганизмы — источники природных антиоксидантов для коррекции мужского бесплодия 308
Шумицкая А. А., Благодарная Е. Д., Исаева Ю. А., Акасов Р. А., Лупоносов Ю. Н. Новый класс органических фотосенсибилизаторов на основе сопряженных полимеров для эффективной терапии рака 310
Щекутьева Е. О., Бобков Г. А. Сравнительный анализ изотермических амплификаций с полимеразной цепной реакцией для диагностики патогенных бактерий лососевых рыб 312
Щелконогов В. А., Козлова О. А., Иншакова А. М., Дарнотук Е. С., Шипелова А. В., Прохоров Д. И., Баранова О. А., Чеканов А. В., Шастина Н. С., Соловьева Э. Ю., Федин А. И. Антиоксидантные и антиагрегантные свойства наноконструкций с липоевой кислотой 314
Яголович Е. И., Джуманиязова И. Х. Влияние компонента противогололедных материалов на поведенческую активность *Danio rerio* 316
Яковлев В. А., Литвинова В. Р., Тигеева Е. В., Рудометова Н. Б., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Макарова К. П., Вахитов Д. И., Кисакова Л. А., Карпенко Л. И., Рудометов А. П. Доставка мРНК, кодирующей ген гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа A/H5Nx, с использованием липидных наночастиц 318
Яровикова М. С., Буслаева Е. А., Бочкарева М. Д., Хасаншина З. Р. Влияние модификации терминатора на стабильность мРНК и продуктивность штаммов *E. coli* 321

Раздел III. **Биофизика**

Dementev S. A., Podarov R. A., Sannikova N. E., Polienko Y. F., Kirilyuk I. A., Krumkacheva O. A. Functional properties of spin trapping agents for enhanced detection of singlet oxygen in photodynamic therapy applications 324
Dzhabrailov V. D., Turchaninova E. A., Slotvitskiy M. M., Ovechkina V. S., Karpov R. M., Mozhaev A. A., Agladze K. I., Tsvelaya V. A. Development of a technique for noninvasive cardiac pacing based on thermosensitive channels 325
Kozhevnikova D. D., Yashchenok A. M., Petukhov A. V., Barulin A. V., Novikov S. M. Analysis of Extracellular Vesicles at the Single Level Using Fluorescence Correlation Spectroscopy Assisted by Microfluidics 326
Oguji C. E., Seriev I. R., Skamnitskiy D. V., Shilyagina N. Yu. Ionizing radiation induces mono- and multinucleated giant cancer cells in a dose-dependent manner in HeLa cells 327

Дениева З. Г., Батищев О. В. Пептид слияния FP1 S-белка коронавируса SARS-CoV-2 формирует и ингибирует поры в липидных мембранах аналогично антимикробным пептидам 328
Друсалевич О. В., Рыскина А. М., Кокаева И. С., Ковальчук С. И., Шелухина И. В. Изучение процессов активации и дифференциации провоспалительных макрофагов методом ВЭЖХ-МС 330
Душенко М. В., Абдуллаев С. А., Осипов А. Н. Повреждение митохондриального генома в мезенхимальных стволовых клетках после воздействия рентгеновского излучения в малой и средней дозах 332
Заварыкина А. В., Парчайкина М. В., Ревина Э. С., Ревин В. В. Сравнительный анализ влияния веществ гликопротеиновой и полифенольной природы на содержание липидного и белкового компонента соматических нервов при повреждении 335
Ишемгулов А. Т., Давыдова О. К., Григорьев М. Е., Абдрахманова В. А., Летута С. Н. Фотодинамическое действие пигмента *Pseudomonas aeruginosa* на бактериальные биопленки 337
Кольченко А. М., Власов А. А., Степанов М. Е., Егорова Т. В., Хайдуков Е. В., Акасов Р. А. Мышиная модель дорсальной камеры для фотодинамической терапии 339
Колян А. С., Деева А. А. Исследование структурной динамики алкогольдегидрогеназы I *Saccharomyce cerevisiae* в системах с ДМСО и дизельным топливом 341
Копылова Д. А., Роденко Н. А., Васильева Т. И., Бледных О. В., Глущенков В. А. Влияние импульсного магнитного поля с различным числом импульсов на биологическую активность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 343
Левковская Г. М., Чавчавадзе Е. С., Боголюбова А. Н., Беляева Е. В., Лисицын С. Н., Степанова М. Ю., Каспаров А. К. Нетрадиционные исследования с помощью СЭМ как возможность увеличения информативности палинологического метода 345
Миронов П. А., Дубовский П. В., Баранова А. А., Алферова В. А., Шенкарев З. О. Нейросетевой скрининг и структурно-функциональное исследование линейных пептидов из яда паука с активностью против метициллинрезистентного золотистого стафилококка 348
Митин Д. Е., Кирилюк И. А., Добрынин С. А., Дмитриенко Е. В. Бимодальные контрастные агенты на основе наночастиц сывороточного альбумина человека для магнитно-резонансной и флуоресцентной томографии 350
Морозова Ф. В., Голышев В. М., Ломзов А. А. Субстратные и физико-химические свойства фосфорамидных азольных олигонуклеотидов 352
Руппель Л. Э., Синицына А. П., Цвелая В. А., Агладзе К. И. Разработка инструмента для оцифровки распространения волн возбуждения в сердечной ткани по записям оптического картирования и прогнозирования влияния препаратов-антиаритмиков 353
Савицкий М. А., Кузнецов А. В. Цветовые предпочтения инфузорий *Paramecium caudatum* 355
Сальседо М. Р. К., **Степанова Л. В., Коленчукова О. А.** Взаимосвязь молочной продукции коров с биохимическими показателями сыворотки крови и слюны 357
Слотвицкий М. М., Медведев М. С., Пашинцев Г. С., Грязнов В. А., Качан В. С., Агладзе К. И., Цвелая В. А. Исследование динамики фотообесцвечивания молекул NADH в сердечной ткани для обобщения метода ED-FRAP и детекции ишемических повреждений 359
Смольянова Н. А., Гараева Н. С., Агбоигба Э. Э. К., Трахтманн Н. В., Валидов Ш. З., Иваньков А. И., Рогачев А. В., Усачев К. С., Тощаков С. В., Патрушев М. В., Лаврик И. Н., Юсупов М. М., Никулин А. Д. Анализ структурных характеристик фермента целлюлаза (*cel*7465) методами малоуглового рентгеновского рассеивания 361
Сучков М. Ю., Кузяева В. И., Сочилина А. В., Акасов Р. А., Егорова Т. В., Генералова А. Н. Механические свойства гидрогеля на основе модифицированной гиалуроновой кислоты и его перспектива в аддитивных технологиях 363
Устьянцева Д. С., Конникова М. Р., Черкасова О. П., Николаев Н. А. Применение терагерцовых метаматериалов для детектирования стероидных гормонов 365
Федотова И. В. Механизмы нарушения тромбоцитарной агрегации при болезни Виллебранда: моделирование молекулярной динамики комплекса A1 VWF — GPIb 367
Чепис М. В., Сивкова Д. С., Ральченко И. В. Оптический принцип исследования агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с гипотиреозом и узловым нетоксическим зобом 369
Шрам П. П., Акасов Р. А., Егорова Т. В. Антибактериальные и токсические фотосенсибилизирующие свойства флавинмононуклеотида 371
Яншин А. О., Гладышева А. В. Интеграция методов вычислительного моделирования, малоуглового рентгеновского рассеяния и рентгеноструктурного анализа для изучения структуры нуклеопротеинов недавно обнаруженных вирусов (*Beiji nairovirus* и *Songling virus*) 373

Яровой А. С., Синицина А. П., Цвелая В. А., Дунин-**Барковский В. Л.** Исследование синаптических связей и функций клеток мозжечка с помощью их компьютерного моделирования 375

Раздел IV. **Вирусология**

Kikhai T. F., Agapkina Yu. Yu., Gottikh M. B. Effects of human SFPQ protein on the initial stages of HIV-1 life cycle 377
Mansour O., Danilenko D. M., Komissarov A. B. Genetic diversity and molecular analysis of human parainfluenza virus types 1 and 3 in Saint Petersburg, Russia 378
Алешина Ю. А., Лукашев А. Н. Новые критерии вида для астровирусов млекопитающих: описательные (различие геномов) и функциональные (репродуктивный барьер) 379
Алхиреенко Д. А., Гладышева А. В. Разработка нового подхода исследования структуры нетранслируемых регионов вирусов с сегментированным геномом на примере *Kindia tick virus* 381
Антонец М. Е., Боднев С. А., Роцкая У. Н., Крюков В. Ю., Антонец Д. В. Обнаружение вируса картофеля S в транскриптомных данных колорадского жука 383
Апанасевич М. В., Дубовицкий Н. А., Дёрко А. А., Хозяинова А. А., Коханенко А. А., Артемов Г. Н., Денисов Е. В., Тарасов А. М., Бурлак В. А., Шестопалов А. М., Шаршов К. А. Обнаружение нового варианта вируса *Yezo* в трех видах иксодовых клещей на территории Томской области при помощи метагеномного секвенирования 385
Бабошко Д. А., Тотменин А. В., Даудова М. Г., Елфимов К. А., Ачигечева П. Ю., Дандамаев Д. К., Осипова И. П., Койчуев Х. Г., Гапизова Х. Ф.-К., **Готфрид Л. Г., Шахбанова З. Р., Гашникова Н. М.** Молекулярная эпидемиология вируса лейкоза крупного рогатого скота в Республике Дагестан 387
Бердиева С. Б., Демина Д. С., Осипов И. Д., Маслов Д. Е., Васиховская В. А., Забелина Д. С., Мусабаев Э. И., Кушакова Д. Ш., Аглетдинов Э. Ф., Нетёсов С. В. Распространенность аденовирусов и их серотипическое разнообразие у пациентов с тяжелыми ОРЗ в Ташкенте (Узбекистан) в 2024 году 390
Ветрова А. Н., Курашова С. С., Егорова М. С., Дзагурова Т. К. Персистенция штаммов хантавируса Пуумала в культуре клеток Vero 392
Глущенко А. Г., Чанышев М. Д., Чернышова А. С., Гришаева А. А., Макашова В. В., Хафизов К. Ф. Полногеномный анализ генетической изменчивости вируса гепатита С в российской популяции 394
Демина Д. С., Бердиева С. Б., Осипов И. Д., Маслов Д. Е., Позднякова Л. Л., Ульянова Я. С., Томилова Ю. Е., Аглетдинов Э. Ф., Нетесов С. В. Генетическое разнообразие аденовирусов и респираторно-синцитиальных вирусов среди пациентов Городской инфекционной клинической больницы № 1 Новосибирска с диагнозом ОРЗ 396
Дроков Д. В., Лапшин К. А., Семенова А. В., Гражданцева А. А., Легкодымов А. А., Кочнева Г. В. Исследование рекомбинантных вирусов осповакцины, экспрессирующих трансгены апоптина и симпортера натрия/йодида, для тераностики опухолей с использованием синхротронного излучения 399
Дубровская Э. В., Онхонова Г. С., Иматдинов И. Р. Комплексный подход для получения и изучения гликопротеинов циркулирующих вариантов вируса гриппа a/H5Nx 401
Елбоева П. И., Насыров Т. Р., Давидюк Ю. Н., Кабве Э. Первый случай обнаружения *orthohantavirus dobravaense* в Приволжском федеральном округе 403
Елфимов К. А., Готфрид Л. Г., Гашникова М. П., Тотменин А. В., Гашникова Н. М. Метод исследования биодоступности лекарственных препаратов с помощью проточной цитометрии с визуализацией 405
Железнова А. С., Свирин К. А., Карташов М. Ю. Анализ клинически значимых мутаций среди изолятов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Гвинейской Республики 408
Желтухина А. И., Фадеев А. В., Писарева М. М., Едер В. А., Коржанова М., **Комиссаров А. Б., Даниленко Д. М.** Генетическая характеристика вирусов гриппа в викторианской линии, циркулировавших в России в эпидемический сезон 2024–2025 годов 410
Илюхина А. А., Зорков И. Д., Гроусова Д. М., Коробова Е. В., Зубкова О. В., Должикова И. В. Разработка летальной модели лихорадки Западного Нила для исследования протективной эффективности различных препаратов 412
Калянова А. С., Гаджикурбанов М. Н., Литов А. Г., Карганова Г. Г. Слепни как потенциальные векторы арбовирусов: метагеномика и экспериментальная оценка репликации вирусов 414

Киренская В. В., Ложков А. А., Гаршинина А. В., Забродская Я. А., Васин А. В. Экспрессия цитокинов, факторов воспаления и нейротропных факторов в тканях мозга у потомства мышей, инфицированных вирусом гриппа А 416
Красникова С. И., Шарабрин С. В., Рудометов А. П., Карпенко Л. И. Трехвалентная мРНК-вакцина против сезонного гриппа 418
Кудров Г. А., Зайнутдинов С. С., Шульгина И. С., Зайковская А. В., Сергеев А. А., Кочнева Г. В. Активность антител, индуцированных рекомбинантной интраназальной вакциной на основе вируса Сендай, против разных вариантов SARS-CoV-2 420
Ляпин П. К., Дюдее^{n}а Е. С., Иматдинов И. Р. Синтез конформационно замкнутых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и исследование их активности в отношении вируса гриппа А 422
Маличава М. М., Алешина Ю. А. Анализ временной динамики естественной рекомбинации вируса ящура 424
Мешкова Ю. В., Маренина М. К., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н., Пронина А. А., Санчес-Пиментель А. П., Зубков Ф. И., Яровая О. И., Хвостов М. В. Замещенные тетрагидрохинолины как перспективные ингибиторы основной протеазы вирусов SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 и MERS-CoV 426
Мокроносов М. С., Драчкова И. А., Трубенков К. С., Тимохина Т. С., Трегубчак Т. В., Сивай М. В., Боднев С. А. Анализ генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, циркулирующих на территории 12 субъектов Российской Федерации 428
Мурзин А. И., Елфимов К. А., Тотменин А. В., Гашникова Н. М., Зырянова Д. П., Готфрид Л. Г., Екушов В. Е., Халиков М. Р. Адаптация и применение мультиплексной системы на основе цифровой ПЦР для анализа провирусных резервуаров у лиц, живущих с ВИЧ на территории Российской Федерации 430
Надтока М. И., Бухарина А. Ю., Роев Г. В., Пересадина А. В., Выходцева А. В., Гончаров С. Е., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г. Современные методы таргетного секвенирования как инструмент диагностики патогенов 432
Никонова А. Э., Лосич М. А., Зайкова О. Н., Авидзба В. И., Горухчиева Ф. А. Однократная иммунизация векторной вакциной индуцирует длительную антирабическую защиту у макаков-резусов 434
Оськина А. С., Сергеев Ал. А., **Карташов М. Ю., Сергеев А. А., Пшеничная Н. Ю., Гопаца Г. В., Родникова Е. М., Щербаков А. И., Кутырев И. В., Nzoyikorera N., Nyandwi J.** Дифференциальная лабораторная диагностика оспы обезьян у пациентов с характерной клинической картиной на территории Республики Бурунди в 2024 году 437
Пономарёв А. Л., Козлова Ю. Н., Байков И. К., Бардашева А. В., Бабкин И. В., Тикунова Н. В. Бактериофаг *Acinetobacter baumannii* AciB_323: характеризация генома, исследование литических свойств, клонирование и оценка его деполимеразы 439
Рак А. Я., Прокопенко П. И., Музурова В. В., Исакова-**Сивак И. Н.** Влияние адаптивных мутаций на антигенные свойства белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 441
Ребус М. Е., Филиппова Е. И., Проценко М. А., Макаревич Е. В., Репкова М. Н., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Шишкина Л. Н. ДНКзим-содержащие нанокомпозиты, активные в отношении вируса гриппа A/H5N1 443
Ребус М. Е., Филиппова Е. И., Карпова Е. А., Проценко М. А., Храмова Е. П., Макаревич Е. В., Козлова М. В., Васильева О. Ю., Шалдаева Т. М., Шишкина Л. Н. Исследование противовирусной активности экстрактов корней *Rosa* spp. в отношении вируса гриппа А 445
Ребус М. Е., Макаревич Е. В., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Репкова М. Н., Зарытова В. Ф., Левина А. С., Шишкина Л. Н. Олигонуклеотид-содержащие нанокомпозиты, активные в отношении вирусов простого герпеса первого и второго типов 447
Ребус М. Е., Филиппова Е. И., Проценко М. А., Макаревич Е. В., Челобанов Б. П., Репкова М. Н., Левина А. С., Зарытова В. Ф., Шишкина Л. Н. Подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 *in vitro* немодифицированными siRNA в составе нанокомплексов на основе наночастиц аминопропилсиланола 449
Савельев Н. С., Плетюхина Ю. В., Игнатьев Г. М., Аракелов С. А., Савельева А. П., Поляков Д. Н., Лемешева В. С., Грудина В. С., Романов А. С., Кахина Харкин М. Э., Ячменева А. А., Рабдано С. О. Дозозависимый гуморальный иммунный ответ и вируснейтрализующая активность сывороток, полученных при иммунизации рекомбинантными антигенами вируса денге 452

Свирин К. А., Половкова О. Г., Федорова Е. С., Железнова А. С., Карташов М. Ю. Распространенность мутаций, ассоциированных с лекарственной резистентностью вируса гепатита С, у субтипов 1b и 3a 454
Тигеева Е. В., Яковлев В. А., Старостина Е. В., Боргоякова М. Б., Протопопова Е. В., Святченко В. А., Локтев В. Б., Кисакова Л. А., Кисаков Д. Н., Карпенко Л. И. Иммуногенные и протективные свойства двухкомпонентных ДНК-вакцин, кодирующих Т-клеточный полиэпитопный иммуноген и полипротеин prM-E вируса клещевого энцефалита 456
Тищенко С. А., Соколова А. С., Пушкарева Ю. Г., Бормотов Н. И., Шишкина Л. Н., Салахутдинов Н. Ф. Синтез новых потенциальных антиортопоксвирусных соединений на основе бициклических монотерпеноидов камфоры, изокамфанона и нопола 458
Трубенков К. С., Драчкова И. А., Мокроносов М. С., Тимохина Т. С., Боднев С. А. Молекулярно-эпидемиологический анализ респираторных вирусных инфекций у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 в 2024–2025 годах 460
Хорчун А. Б., Дёрко А. А., Дубовицкий Н. А., Андрияш М. А., Шаршов К. А. Разнообразие субтипов вируса гриппа А, выявленных у диких водоплавающих птиц Амурской области 462

Раздел V. **Молекулярная биология**

Alsalloum I., Rakhov I. A., Bazovkina D. V., Kulikov A. V. A functional polymorphism in the mouse *Th* gene alters tyrosine hydroxylase activity and midbrain dopamine levels 464
Hussein Z., Da Silva S. R., Santos I. P., Juste J. P., González G. B. Development of ZIF-8 nanocarriers for targeted intracellular delivery of nucleic acids 466
Mantsurova K. S., Hussein Z., **Kolpashchikov D. M.** Selection of novel target genes for antisense oligonucleotide-based therapy in colorectal cancer 468
Mikheeva E. I. Integrated approach to monitoring microbiological corrosion induced by sulfate-reducing bacteria 469
Serebrennikova M. Y., Grafskaia E. N., Brovina K. A., Manuvera V. A., Kharlampieva D. D., Bobrovsky P. A., Lazarev V. N. Identification and functional characterisation of new antimicrobial peptides from medicinal leech by expressing their coding genes in *Escherichia coli* 470
Sokolova S. E., Gubina M. A. Investigation of the rs4680 polymorphism of the COMT gene in individuals dependent on synthetic cathinones and cannabinoids 471
Wu T. X., Kulebyakin K. Y., Putlyaeva L. V. Live tracking of heterochromatin remodelling in mesenchymal stem cells during adipogenic and osteogenic differentiation 472
Zaplavnaia S. S., Velegzhaninov I. O. Engineering a synthetic metabolic pathway in *Escherichia Coli* for cellulose-based isobutene production 474
Алиев Т. И., Иматдинов А. Р., Прудникова Е. Ю., Иматдинов И. Р. Система для геномного редактирования на основе MmCas12m и новых вариантов редакторов оснований 475
Алрхмун С., Перик-Заводский Р. Ю., Фишер М. С., Лопатникова Ю. А., Перик-Заводская О. Ю., Шевченко Ю. А., Назаров К. В., Филиппова Ю. Г., Курилин В. В., Голикова Е. А., Тимашев П. С., Глыбочко П. В., Сенников С. В. Молекулярные механизмы действия TCR-T-клеток против HER2/neu: транскриптомика, секретомика и подавление опухоли *in vivo* 477
Анисимов А. С., Боголюбова И. О. Возрастная динамика коилин-содержащих ядерных телец в кумулюсных клетках преовуляторных фолликулов мыши 479
Асаевич Т. А., Шебардина Н. Г., Новикова Н. Н., Шевелёва М. П., Ильюхин О. Е., Корчуганова Е. А., Иомдина Е. Н., Оганесян О. Г., Шишкин М. Л., Тулуш С. С., Белолипская С. А., Зерний Е. Ю. Механизмы цинк-зависимого повреждения сетчатки при возрастной макулярной дегенерации 482
Бегюм Ш., Капитонова М., Дедков В., Долгова А. Изотермический способ обнаружения РНК энтеровирусов на основе дезоксирибозима 484
Безрукова А. И., Башарова К. С., Григорьева Е. В., Павлова С. В., Байдакова Г. В., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н., Усенко Т. С. Альтернативная стратегия терапии GBA1-ассоциированной болезни Паркинсона: модуляция функции глюкоцереброзидазы через путь mTOR 486
Березов Р. В., Кудрявцева А. А., Манухов И. В. Изучение системы рестрикции-модификации BlichA из *Bacillus licheniformis* 488

Буркова Е. Е., Переверзев И. М., Бахно И. А., Яковлева К. И., Довыденко И. С. Дизайн генных конструкций, обеспечивающих экспонирование антигена на поверхности клетки 489
Валинурова М. В., Ишкаева Р. А., Ергешов А. А., Низамов И. С., Салахиева Д. В., Абдуллин Т. И. Исследование дитиофосфатов глутатиона в качестве клеточных антиоксидантов 491
Вахитов Д. И., Кисаков Д. Н., Карпенко Л. И. Получение мРНК-конструкций, кодирующих антитела к вирусу клещевого энцефалита 493
Вахтинский В. М., Тутыхина И. Л., Джарулаева А. Ш., Шмаров М. М. Изучение экспрессии нового IRES для кольцевых РНК-векторов 495
Галабурдина Е. С., Оскорбин И. П., Филипенко М. Л. Клонирование, наработка и выделение белков для рекомбиназной полимеразной амплификации 497
Ганцова Е. А., Вишнякова П. А., Кузнецова М. В., Ельчанинов А. В. Влияние спленэктомии на популяцию синусоидальных эндотелиоцитов в модели регенерации после 70%-й резекции печени мыши 499
Герасимов О. А., Домашева О. Ю., Бушина Л. Г., Козлов И. Б. Способ получения биоконъюгата миРНК-пептид с высоким выходом 501
Горюшко И. М., Анисимова О. К. Характеристика и анализ ключевых генов биосинтеза мелатонина *SNAT1* и *SNAT2* у сортов томата *Solanum lycopersicum* и дикорастущих образцов *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* 503
Громова Е. С., Пономаренко А. И., Ивашкевич Д. Н., Егораева А. А., Султанов Р. М., Манжуло И. В. Противовоспалительная и антиоксидантная активность этаноламидов омега-3 полиненасыщенных жирных кислот 505
Данильченко В. Ю., Иванощук Д. Е., Мустафина С. В., Овсянникова А. К., Рымар О. Д., Шахтшнейдер Е. В. Ассоциация гомозиготного варианта с.1019G>A гена *GCK* с фенотипом MODY 508
Егорова А. Е., Астахова Е. А., Киселева Я. С., Антышева З. Г., Степанова А. А., Акино А. Д., Головкин А. С., Табаков Д. В., Волчков П. Ю. Количественная оценка разнообразия бета-цепей Т-клеточных рецепторов мононуклеаров периферической крови с помощью спектральной проточной цитометрии и bulk-RNA-TCR-секвенирования 510
Ермолаева Д. О., Сапарова В. Б., Афанасьева А. Н., Гончарова А. С., Сельменских Т. А. Разработка методики оценки активации рецептора GLP-1R на клеточной линии *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид в тесте «Кальциевые токи» 513
Ермолаева Д. О., Сапарова В. Б., Афанасьева А. Н., Гончарова А. С., Сельменских Т. А. Валидация методики оценки активации рецептора GLP-1R *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид 515
Ерхова К. А., Азарнова Т. О., Монстакова Т. В. Реализация антиоксидантных свойств никотинамидадениндинуклеотида при трансовариальном использовании у кур 517
Казаков Е. П., Киреев И. И. Индивидуализация сестринских хроматид в интерфазе на фоне нокаута когезина 519
Козлова А. Д., Смолко Н. А., Мухамедшина Я. О., Камальдинова Д. Р., Кабдеш И. М., Файзуллина Р. А. Генетические вариации фолатного цикла и их роль в развитии расстройств аутистического спектра у детей: анализ полиморфизмов MTHFR, MTR, MTRR 521
Коток А. Ю., Степаненко Е. А., Макарова И. В., Марков Д. Д., Андреева Л. Е., Герасимова Т. П., Щербатова Н. А., Тарантул В. З., Ненашева В. В. Влияние гиперэкспрессии гена *TRIM14* человека на поведение трансгенных мышей и экспрессию генов семейства *TRIM* в мозге в условиях ЛПС-индуцированного нейровоспаления 523
Кудашева Э. Р., Москалев А. А., Гуватова З. Г. Оценка влияния гликирования микроокружения на профиль экспрессии генов матрисома дермальных фибробластов человека *in vitro* 525
Кудряшова Т. Р., Крюков А. А., Юрков А. П. Разработка метода оценки эффективности стимуляторов роста растений на основе арбускулярно-микоризных грибов 527
Кузнецова Е. В., Немтарев А. В., Салахиева Д. В., Салихова Т. И., Миронов В. Ф., Абдуллин Т. И. Синтез и антибактериальная активность наночастиц серебра, стабилизированных полигалактуронатом натрия 529
Куликов В. В., Щербаков Д. Н. Создание лентивирусного вектора с дефектом интегразы 530
Ларионов М. М., Филюшин М. А. Профиль экспрессии генов каротиногенеза выявляет особенности биосинтеза каротиноидов в органах чеснока 532
Летягина А. Е., Болдырева Л. В., Огиенко А. А., Галимова Ю. А., Андреева Е. Н., Омелина Е. С. Использование терминаторов транскрипции РНК-полимеразы II для регуляции эписомальной экспрессии генов млекопитающих 534

Мартюшова В. Г., Жежера М., **Седых С. Е.** Анализ термодинамических и кинетических характеристик метилзависимой эндонуклеазы рестрикции *Gla*I 536
Михеева А. М., Прасолов В. С., Лебедев Т. Д. Формирование межклеточных контактов защищает клетки солидных опухолей от действия ингибиторов Src, и их ингибирование может быть использовано для преодоления этой устойчивости 537
Мустафин Д. А., Краснова С. А., Баранов М. С., Богданова Ю. А. Оптимизация свойств генетически кодируемой метки на основе флуороген-активирующего белка picoFAST 539
Назарова А. Г., Демченко А. Г., Киян Т. А., Рыжкова О. П., Брагина Е. Е., Вейко Р. В., Смирнихина С. А., Кондратьева Е. И. Применение культур клеток назального эпителия в диагностике первичной цилиарной дискинезии 541
Незнамов А. Н., Байкова Ю. П., Кубекина М. В. Транскрипционная киназа CDK19 участвует в регуляции иммунометаболических процессов в первичных макрофагах мыши 542
Нефёдова В. В., Клейменов С. Ю., Лапшина К. К., Матюшенко А. М. Поиск молекулярных детерминант развития дилатационной кардиомиопатии и губчатого миокарда на примере мутаций в гене *TPM1* 544
Осипова В. Р., Лаврушкина С. В., Киреев И. И. Влияние ингибиторов ZMPSTE24 на репарацию по пути негомологичного соединения концов индуцированных двунитевых разрывов ДНК в клетках фибросаркомы HT1080 546
Отводникова Д. Е., Папонов Б. В., Цымбал С. А. Изучение взаимодействия тиазолопиримидиновых производных с нуклеиновыми кислотами в контексте противоопухолевой активности 548
Пашкова А. И., Соболева С. Е. Высокомолекулярные белковые комплексы голотурии *Eupentacta fraudatrix* с протеазной активностью 550
Пчелинцев М. И., Обозный А. А., Глухов А. И. Теломеры и теломераза как онкомаркеры: возможности для выявления и лечения рака 552
Родный А. Я., Черендина К. П., Базовкина Д. В. Влияние изоформ STEP61 и STEP46 на нормальное и патологическое поведение и регуляцию BDNF/ERK/NMDA-сигналинга в гиппокампе мышей 554
Рябова Е. И., Деркаев А. А., Довгий М. А., Хоссаин Р. М., Щебляков Д. В., Есмагамбетов И. Б. Сравнительный анализ генетических конструкций для доставки и экспрессии гена тяжелоцепочечного антитела в составе rAAV 556
Савинова Е. А., Проскурнина Е. В., Созарукова М. М., Ершова Е. С., Каменева Л. В., Вейко Н. Н., Иванов В. К., Костюк С. В. Цитотоксичность и генотоксичность конъюгированного с альбумином наноразмерного диоксида церия 558
Савостьянова Т. А., Жукова Ю. В., Лопатникова Ю. А., Сенников С. В. Показатель экспрессии рецепторов IL-1 на иммунокомпетентных клетках здоровых доноров 560
Силина М. В., Джалилова Д. Ш., Цветков И. С., Макарова О. В. Молекулярно-биологические особенности реакции организма на острую гипоксическую нагрузку у животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода 562
Силина М. В., Джалилова Д. Ш., Кириллов В. М., Макарова О. В. Уровни экспрессии мРНК и микроРНК в лейкоцитах периферической крови как биомаркеры исходной устойчивости к гипоксии у лабораторных животных 564
Труфанов В. О., Беленькая С. В. Определение аминокислотной последовательности и разработка продуцента мутантного варианта протеазы ВИЧ-1, циркулирующего на территории Сибирского федерального округа 566
Угрюмов В. С., Прусаков Р. З., Вахтинский В. М. Получение аденовирусного вектора, несущего ген человеческого кателицидина 568
Урусов А. Е., Невинский Г. А. Антитела-абзимы крови мышей, склонных к индуцированному развитию аутоиммунного энцефаломиелита 571
Шевченко А. Д., Андреева Е. Н. Сравнение активности промоторов при сайт-специфической интеграции репортерной конструкции в геном клеток яичника китайского хомячка (CHO) 572
Шхалахова Р. М., Самарина Л. С., Малюкова Л. С. Влияние генотипа и сезона на транскриптомные профили растения чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) 574
Якушева Е. А., Колосов П. В., Шарлаева Е. А., Щербаков Д. Н. Интеграция в геном *Bacillus licheniformis* Kh-430 гена кератиназы 576

Раздел VI. **Фундаментальная медицина**

Al-Alwani Y. M., Tarasova I. A. Nutritional status of end-stage achalasia patients 578
Behmard N., Tarasova I. A., Shestakov A. L. The oral iron absorption test in patients with hiatus hernia 580
Etezova F. M., Nartsissov Y. R., Mashkovtseva E. V. Modeling of the spatiotemporal distribution of medicines 582
Gaptulbarova K. A., Kravtsova E. A., Dolgasheva D. S., Tsydenova I. A., Vtorushin S. V., Litviakov N. V. Stages of lysosomal entosis in cancer tissue lung and colorectal cancer 583
Hosseini H., **Tarasova I. A.** Vacuum aspiration and NPWT in chest wound infections and pleural empyema 585
Maksumova A. M., Abdulagatov I. M., Gadzhimuradov S. G., Gafurova M. N. Atomic layer deposition of novel nanomaterials based on metal-doped titanium dioxide to combat antibiotic-resistant bacteria 587
Poletika V. S., Reingardt G. V., Kurnosenko A. V., Kolobovnikova Yu. V., Urazova O. I. Combined and individual immunomodulatory effects of colorectal cancer-derived galectin-1 and -3 on $CD4^+$ T cell function 589
Sounbuli K., **Alekseeva L. A., Sen A. V.**'kova, **Markov O. V., Savin I. A., Zenkova M. A., Mironova N. L.** Beyond NETs: DNase I treatment shows immunostimulatory effects and modifies neutrophil phenotype and functionality in tumor-bearing mice 590
Turchaninova E. A., Robustova S. D., Kovalenko S. G., Dzhabrailov V. D., Dolgodvorova A. A., Romanova S. A., Slotvitsky M. M., Agladze K. I., Tsvelaya V. A. Study of the possibilities of restoring the conduction of wave excitation in fibrous areas of the myocardium using reprogramming of non-excitable cardiomyocyte cells 591
Абдулкадиева М. М., Слонова Д. А., Антонова Н. П., Собянин К. А., Литвиненко В. В., Паршина О. В., Гусева Т. С., Домнин П. А., Васина Д. В., Сысолятина Е. В. Ранозаживляющий потенциал интерферона α-2b и эндолизина GRC-ML07 при терапии инфицированных ран в условиях нарушенного иммунного статуса 592
Абрамова Е. А., Прокопов А. Ю., Рыбина И. В., Слесарев Г. П. Фотопротекторные и антисенильные эффекты комбинированных растительных экстрактов на дермальных фибробластах человека 594
Акрамова Э. Р., Шарифьянова Ю. В., Гайнуллина Д. Х., Шмелькова П. Н., Павлов В. Н., Еникеева К. И. Транскриптомный профиль циркулирующих иммунных клеток при раке простаты в разрешении единичных клеток 596
Аладьев С. Д., Соколов Д. К., Политко М. О., Григорьева Э. В. Влияние селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) на клеточный состав и внеклеточный матрикс ткани головного мозга мышей 598
Алибаков С. Х., Мухамадеев Р. Р., Кагирова Э. М., Асадуллина Д. Д., Урманцев М. Ф., Павлов В. Н. Эпигенетические изменения микроРНК и их роль в прогрессии рака простаты с высоким риском рецидива 600
Алсаллум А., Лопатникова Ю. А., Фишер М. С., Шевченко Ю. А., Филиппова Ю. Г., Шаньгина П. А., Сенников С. В. Эффективная индукция клональной экспансии E7-специфических Т-клеток: модифицированный протокол на основе дендритных клеток 602
Анудариева А. А., Центалович Ю. П., Яньшоле В. В. Метаболомное профилирование сыворотки крови пациентов с диабетической язвой стопы 604
Баженов Е. Д., Васильева Н. С., Агеенко А. Б., Кочнева Г. В. Исследование потенциала рекомбинантных вирусов осповакцины для тераностики глиом 606
Баландина А. А., Донников М. Ю., Морозкина А. В., Аксарин А. А., Видуто В. Е. Молекулярный ландшафт солидных опухолей: создание биоколлекции и секвенирование нового поколения для персонализированной онкологии 608
Баскакова К. О., Кузьмичев П. К., Охрименко И. П., Карбышев М. С. Функциональная характеристика одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела против hTMEPAI, полученного из крысиной гибридомы 610
Басов Н. В., Рогачев А. Д., Бутикова Е. А., Сотникова М. А., Сотникова Ю. С., Патрушев Ю. В., Мельченко М. А., Разумов И. А., Салахутдинов Н. Ф., Покровский А. Г. Комбинация протокола пробоподготовки клеточных образцов и аналитического подхода для таргетированного метаболомного скрининга методом ВЭЖХ-МС/МС 612
Башарова К. С., Безрукова А. И., Байдакова Г. В., Милюхина И. В., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н., Усенко Т. С. Оценка перспектив использования ингибиторов LRRK2 для лечения заболеваний, обусловленных нарушением функции лизосомной гидролазы глюкоцереброзидазы, на пациент-специфичных клетках 614

Борисова А. А., Ситников П. К., Тамкович С. Н. Уровень опухоль-ассоциированных микроРНК в экзосомах крови больных остеогенными саркомами до и после терапии 616
Водопетова М. А., Глазьева В. С., Раднаева А. В., Александрушкина Н. А., Макаревич П. И. Потенциал аденоассоциированных вирусов как инструмента генной терапии стриктур пищевода 618
Воробьев А. М., Зубкова Е. С., Морозова Е. В., Киселева И. А., Пасивкина М. А., Воробьева А. А., Ефимова О. Г., Маркевич П. С., Долинер Н. Д., Тиванова Е. В., Алехнович А. В., Алешкин А. В., Тутельян А. В., Акимкин В. Г. Персонализированный подбор бактериофагов в комплексной терапии ИСМП у пациентов с огнестрельными и ожоговыми ранениями 620
Гапурова А. Х., Морозкина А. В., Донников М. Ю. Оценка совместного действия генетических факторов гемостаза и метаболизма фолатов в развитии осложнений беременности с использованием биоресурсной коллекции лаборатории «Биобанк Югры» 622
Гладких Е. С., Попова Н. Г. Результаты внедрения в клиническую практику фокусной эхокардиографии у новорожденных детей 624
Глазьева В. С., Водопетова М. А., Шершнева А. В., Каргалинина К. Г., Макаревич П. И., Александрушкина Н. А. Разработка технологии трансплантации клеточных пластов из МСК для клинического применения в целях подавления фиброза 626
Головачева У. Е., Пильщикова К. А., Маковская А. М. Оценка эффективности модификации нейлона L-аргинином для шва нерва 628
Грищук Я. К. Особенности метаболического профиля Т-лимфоцитов периферической крови до и после магнитной сепарации 630
Данилова А. А., Гусев К. А., Маймистов Д. Н., Флисюк Е. В. Стратегия улучшения биофармацевтических свойств диосмина и очищенных микронизированных флавоноидных фракций в составе ангиопротекторных лекарственных средств методом экструзии горячего расплава 632
Демирел Р., **Мирошниченко С. К., Стеценко Д. А., Маслов М. А., Зенкова М. А.** миРНК-направленные мезильные олигонуклеотиды как инструмент преодоления множественной лекарственной устойчивости: аддитивный эффект с цисплатином и доксорубицином 634
Деулин И. Ю., Троицкий А. В., Янковская С. В., Селятицкая В. Г., Воевода М. И. Применение растительной композиции, содержащей биологически активные вещества с доказанной эффективностью, как способ коррекции метаболических расстройств, связанных с ожирением 636
Егораева А. А., Манжуло И. В., Ивашкевич Д. Н. Этаноламид стеаридоновой кислоты модулирует глиальную активность при легкой черепно-мозговой травме у мышей 638
Емельянова Е. П., Семенова О. В., Салмин А. В., Шварц Я. Ш. Выраженность фенотипа trained immunity в моноцитах при воздействии модуляторами активности метаболических путей 640
Ермаков Е. А., Меламуд М. М., Толмачева А. С., Новикова Т. С., Сизиков А. Э., Невинский Г. А., Бунева В. Н. Новые биомаркеры для дифференциальной диагностики ревматоидного артрита: сравнительный анализ четырех ревматических заболеваний 642
Ерохина Е. Г., Эпова Е. Ю., Трубникова Е. В., Никольская Е. Д., Курочкин И. Н. Экспрессия гена, кодирующего белок с LysM-мотивом, из *Pieris rapae* в *Escherichia coli* 644
Замотаева Т. Л., Черкашин Е. А. Эпидемиологические аспекты паротитной инфекции в г. Москве 646
Золотарева А. С., Шипунова В. О. Разработка методов системной доставки адресных наноструктур для терапии социально значимых заболеваний 648
Иванов А. М., Попов А. А., Степанчук Я. К., Гридина М. М., Фишман В. С. Увеличение точности детекции хромосомных аномалий эмбрионов при использовании метода BIOP-C: клинический случай 650
Калинчук А. Ю., Пацкан И. А., Царенкова Е. А., Таширева Л. А. Пространственная характеристика участков опухоли, обогащенных макрофагами, при тройном негативном раке молочной железы 653
Каменков С. С., Чечехин В. И., Зиновьева А. А., Тюрин-**Кузьмин П. А., Кулебякин К. Ю., Чечехина Е. С.** Неканонический кальциевый ответ на инсулин в сенесцентных МСК жировой ткани как потенциальный механизм адаптации клеток в условиях нарушенного гомеостаза 655
Кан А., Нарыжная Н. В., Килин М., **Граб А. Е.** μ-опиоидные рецепторы как молекулярная мишень для кардиопротекции 657
Карнаухова В. О., Слотвицкий М. М., Синицына А. П., Цвелая В. А. Исследование алгоритмов машинного обучения для создания персонифицированных моделей сердца на основе томографии 659

Киселев А. В., Хохлов А. Л. Влияние гидроксиникотиноилглутамата кальция на модель нарушения условно-рефлекторного обучения у крыс, обусловленного холинергическим дефицитом 661
Косых А. В., Гурская Н. Г., Зарайский А. Г. Изучение процессов ранозаживления мыши под воздействием *Xenopus laevis* AGR 663
Кравченко С. В., Арсентьев К. А., Коновалова С. П. Особенности роста нейронов на полидиметилсилоксановой подложке 665
Крайнова Ю. Д., Морозкина А. В., Донников М. Ю., Магомедова Э. М., Коваленко Л. В. Секвенирование нового поколения в диагностике наследственного рака молочной железы: исследование спектра мутаций у пациенток в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре 667
Краснова О. А., Семенова П. И., Сопова Ю. В., Неганова И. Э. Остеопороз: генетическая предрасположенность и адреналин-зависимые механизмы нарушения остеогенеза 669
Куркова К. И., Риппинен Д. В., Дейнеко Д. В., Гольдберг М. А., Соловьева А. О. Сравнительный анализ остеогенных свойств PCL-матриц с ионными покрытиями (Ca^{2+}/Mg^{2+}) и BMP-2: *in vitro* исследование 671
Лапшина К. К., Нефёдова В. В. Биохимические основы нарушений в регуляции работы тонкой нити, вызванных мутациями в гене *TPM1* 673
Литвинова В. Р., Рудометова Н. Б., Яковлев В. А., Тигеева Е. В., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Кисаков Д. Н., Карпенко Л. И., Рудометов А. П. Разработка и оценка иммуногенности мРНК-вакцины, кодирующей ген гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа A/H5N8 675
Лопатин М. М., Бограя М. М., Воронова С. С., Вульф М. А., Литвинова Л. С. Ландшафт дисрегуляции микроРНК при метаболическом синдроме и коморбидностях: общие и тканеспецифичные паттерны 677
Лысенко М. К., Басов Н. В., Саушкин Н. Ю., Самсонова Ж. В., Морозик Е. Г., Аньков С. В., Филиппова А. Ю., Подтуркина А. В., Павлова А. В., Рогачев А. Д., Покровский А. Г., Ардашов О. В., Волчо К. П., Салахутдинов Н. Ф. Исследование метаболомного ответа перспективного противопаркинсонического агента с использованием метода сухих пятен крови для *in vivo* фармакометаболомного анализа 679
Меламуд М. М., Ермаков Е. А., Бунева В. Н. Гетерогенность пациентов с системной красной волчанкой по уровню ДНКазной активности IgG: связь с анти-ДНК-антителами и клиническими данными 681
Мелентьева Д. М., Зернов Н., Камарян В. С., Макичян А. Т., Унанян Л. С., Попугаева Е. А. Производное пиперазина, активатор TRPC6-канала, обладает нейропротекторными свойствами 684
Мелконян К. И., Асякина А. С., Соловий Д. О. Экспериментальное обоснование использования тенасцина-С при аутодермопластике ожоговых ран 686
Местникова С. С., Павлова А. В., Эверстова С. С., Асекритова А. С., Кылбанова Е. С., Татаринова О. В., Иванощук Д. Е., Семаев С. Е., Шахтшнейдер Е. В. Семейная гиперхолестеринемия в Якутии: клинико-генетический парадокс у якутов 688
Мещерякова Е. И., Одинокова И. В., Кобякова М. И., Фадеев Р. С. Провоспалительная активация индуцирует дисфункцию митохондрий и лекарственную устойчивость у клеток острого миелоидного лейкоза 690
Милетина О. О., Погодаева С. С., Кучур О. А., Антипова Н. В. Ингибирование NONO как стратегия селективного подавления клеток MYCN-амплифицированной нейробластомы 692
Монахова А. А. Модернизация эпидемиологического надзора в условиях пандемии COVID-19: цифровые технологии и молекулярно-биологические исследования 694
Монахова А. А. Анализ кластеризации субъектов Российской Федерации с целью всестороннего изучения динамики заболеваемости населения коронавирусной инфекцией (COVID-19) 695
Надараиа К. В., Имшинецкий И. М., Надараиа М. А., Плешкова А. И., Манжуло И. В., Белов Е. А., Машталяр Д. В. Биоактивные покрытия на 3D-имплантатах из титанового сплава 696
Найденышева З. К., Малеева А. В., Шокина В. А. Связь между Т-клеточным иммунитетом и вакцинацией против коклюша 698
Питухин М. П., Сорокина И. В., Айдагулова С. В., Борисова М. С., Пономарев К. Ю., Толстикова Т. Г., Суслов Е. В., Волчо К. П. Пиненовые производные азаадамантанов: новые агенты с дофаминостимулирующей и противовоспалительной активностью 699
Попов К. А., Ермакова Г. А., Быков И. М. Возможности биохимического прогнозирования рецидивирования злоупотребления алкоголем у лиц с синдромом зависимости 701

Прийменко Н. А., Кветкина А. Н., Климович А. А., Дерявко Ю. В., Попкова Д. В., Овчинникова Э. Ю., Гладких И. Н., Лейченко Е. В. Противовоспалительная активность блокатора TRPV1-канала, пептида HCRG21, в модели острого системного воспаления у мышей 703
Пчелинцев М. И., Меньщиков М. К., Меньщиков К. А. Прогностическая генетическая панель для диагностики кавернозного и системного склероза у мужчин: выбор маркеров на основе биоинформатического анализа 705
Риппинен Д. В., Воробьева М. А., Соловьева А. О., Королев М. А. Анализ противовоспалительной активности ДНК-аптамеров к ФНО-α на *in vitro* модели ревматоидного артрита 707
Саввинова Н. В., Тарасова И. А. Инсулинорезистентность после обширных торакоабдоминальных операций 709
Салопонова А. Е., Матичина А. А., Фаустова Н. М., Макарова М. Н. Возможность применения биомаркеров нарушения функций эндотелия при эректильной дисфункции у крыс на фоне сахарного диабета 711
Сафронова М. Л., Морозкина А. В., Донников М. Ю., Коваленко Л. В. Генетическая предрасположенность к сахарному диабету 1-го типа у населения ХМАО-Югры: результаты молекулярно-генетического исследования биоресурсных коллекций 713
Сергеева О. С., Котова Ю. А. Связь уровня мочевой кислоты с профилем липидов у пациентов с ишемической болезнью сердца: пилотное исследование 715
Сидорова М. С., Дюкина А. Р., Мякишева С. Н., Гриневич А. А., Серов Д. А. Эффект ингибиторов PKC и PI3K при нагреве на колебания кальция и скорости наработки оксида азота в цитоплазме культивируемых эндотелиоцитов кожи мыши в условиях гипергликемии 716
Силина М. В., Джалилова Д. Ш., Диатроптова М. А., Гринь О. О., Бабаев М. А., Макарова О. В. Исследование цитокинового профиля у кардиохирургических пациентов 718
Синицына А. П., Биганов Р. М., Сыровнев В. А., Сергеева О. А., Цвелая В. А. Применение машинного обучения для обнаружения очагов фибрилляции предсердий и моделирования оптимального протокола абляции при интервенционном лечении 720
Слажнева Н. А., Бондаренко Н. А., Воробьева М. А., Шатунова Е. А., Коваль В. В., Омельченко В. О. Олигонуклеотидные аптамеры к антагонистам Wnt-пути Dickkopf-1 и склеростину как перспективные таргетные средства для терапии остеопороза 722
Соколова Т. С., Куленич В. В., Федорова О. С. Микробиота кишечника и ее метаболиты у детей, больных бронхиальной астмой на фоне инвазии *Opisthorchis felineus* 724
Торгунакова Е. А., Сенокосова Е. А., Антонова Л. В. Возможность использования человеческих антител в оценке ремоделирования сосудистых протезов, имплантированных в приматов 726
Туйгунова Д. Б., Гапурова А. Х., Сафронова М. Л., Багиров А. К. Частота и спектр мутаций гена *PIK3CA* у пациенток с раком молочной железы в Ханты-Мансийском автономном округе — Югре: исследование на материале биоресурсной коллекции лаборатории «Биобанк Югры» 728
Ушакова В. М., Зоркина Я. А., Зубков Е. А., Абрамова О. В., Морозова А. Ю., Гурина О. И., Макаров В. А. Перспективы использования нового терапевтического агента на основе виндебурнола для коррекции когнитивных нарушений 730
Федоровский А. П., Усачёв В. А., Кулебякин К. Ю. Молекулярные механизмы регуляции паратгормоном остеогенной дифференцировки МСК жировой ткани 732
Чечехин В. И., Чечехина Е. С., Сюткина В. В., Антропова Ю. Г., Кулебякин К. Ю., Ткачук В. А. Перициты являются ключевыми регуляторами тонуса сосудов жировой ткани млекопитающих 734
Шагабудинова А. К., Кравцова Е. А., Ибрагимова М. К. Маркеры метастазирования рака молочной железы при применении различных схем неоадъювантной химиотерапии 736
Шашнин Д. Д., Ведунова М. В. Влияние генотипа TRP64ARG однонуклеотидного полиморфизма rs4994 гена ADRB3 на липидный профиль пациентов с метаболическим синдромом 738
Шаяхметов Р. И., Ле Т. Ч., Ишметова Д. В., Рахматуллина А. И., Павлов В. Н. Новые молекулярные мишени опухолевых стволовых клеток кастрат-резистентного рака простаты 740
Эверстова С. С., Павлова А. В., Местникова С. С., Асекритова А. С., Кылбанова Е. С., Татаринова О. В. Липопротеин (а) как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у коренного населения Якутии 742
Ягина А. В., Баженова Ю. О. Бактериальный микробиом кишечника как фактор риска развития рака легких 744
Яголович Е. И., Джуманиязова И. Х. Влияние хронического приема аторвастатина на параметры электрической активности сердца мышей 746
Яичков И. И. Изучение фармакокинетики и относительной биодоступности глазной суспензии 5-[5-(трифторметил)-1,2-оксазол-3-ил]-фуран-2-сульфонамида на кроликах 748

Научное издание

XII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ: БИОИНФОРМАТИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ, ВИРУСОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И СПЕЦИАЛИСТОВ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

Сборник тезисов

Ответственная за выпуск *П. И. Юрганова*
Корректоры *Д. И. Ковалёва, П. И. Юрганова*
Верстка *А. С. Терёшкиной*
Обложка *Е. В. Неклюдовой*

Подписано к опубликованию 26.11.2025 г.
Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 97. Усл. печ. л. 90,2.
Заказ № 216.
Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

XII РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ OPENBIO

23–26 СЕНТЯБРЯ 2025 ГОДА

Организатор

ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР КОЛЬЦОВО

При поддержке

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО

Соорганизаторы и организационные партнеры

Вектор

БИОТЕХНОПАРК КОЛЬЦОВО

БИОФАРМ

НОВОСИБИРСКИЙ ОБЛАСТНОЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ФОНД

Стратегические партнеры

ФОНД НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ЮГРЫ

Ассоциации-партнеры

РОССИЙСКИЙ СОЮЗ ХИМИКОВ

Официальные партнеры

helicon

ХИМЕД

БГА БиоГен-Аналитика

АртБиоТех

myco·pro

ИЗКОЛЬЦОВО

Стратегические информационные партнеры

@ наука

Российская Газета РГ

Комсомольская правда

Информационные партнеры

Фарма РФ

GxP news

Аптеки

ЦИНК

РРЛС

INFOPRO 54.RU

NSK.DK.RU

SibRu.com

Формацевтические технологии и упаковка

ЛАБоратория и ПРОизводство

HEALTH NET

Наука в Сибири

Советская Сибирь

NPJ

inScience.News

ведомости

OPENBIO — РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ

исследования | инновации | развитие бизнеса в сфере lifescience

Площадка открытых коммуникакций OpenBio — комплекс мероприятий, посвященных коммерциализации идей и развитию бизнеса в сфере наук о жизни.

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ БИОИНФОРМАТИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, БИОФИЗИКОВ, ВИРУСОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И СПЕЦИАЛИСТОВ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ И ГОСУДАРСТВА

ВЫСТАВКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ

НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ: ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА МИКРОМИРА

ISBN 978-5-4437-1843-9

OPENBIO.RU

LIFESCIENCE EVENT